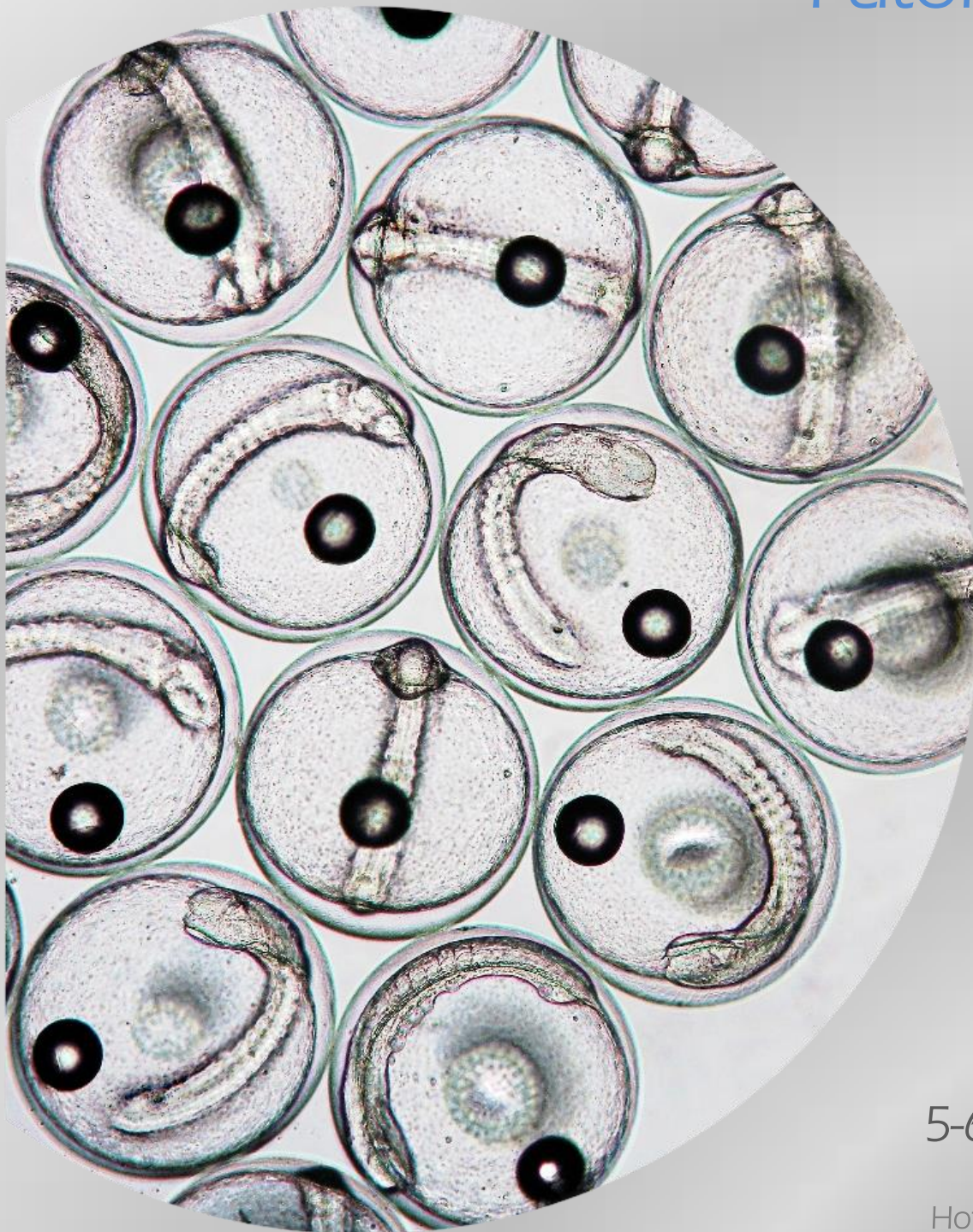


# XXIII CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I. - Società Italiana di Patologia Ittica



5-6 ottobre 2017

Hotel Hilton Garden Inn

LECCE

Atti del

**XXIII CONVEGNO  
NAZIONALE S.I.P.I.**

**Società Italiana di  
Patologia Ittica**



**5-6 ottobre 2017**

Hotel Hilton Garden Inn  
**LECCE**

Con la collaborazione  
degli Ordini dei Medici Veterinari delle province di Brindisi e Lecce



Con il contributo di:





LA CASETTA IN CANADÀ  
di Amato Giuseppe & C.  
Eccellenti per natura



**Comitato organizzatore:**

*Sergio APOLLONIO*

*Manuela DALLA POZZA*

*Fabio MARINO*

*Rosanna PANEBIANCO*

*Marino PREARO*

*Anna TOFFAN*

**Comitato scientifico:**

*Paola BERALDO*

*Monica CAFFARA*

*Manuela DALLA POZZA*

*Andrea FABRIS*

*Maria Letizia FIORAVANTI*

*Gabriella GAGLIO*

*Andrea GUSTINELLI*

*Amedeo MANFRIN*

*Fabio MARINO*

*Marino PREARO*

*Francesco QUAGLIO*

*Tommaso SCANZIO*

*Anna TOFFAN*

*Marco VANELLI*

**Segreteria:**

*Manuela DALLA POZZA*

*Alessandra SILVAGNI*

*Anna TOFFAN*



Con la collaborazione di:



# PROGRAMMA

## Giovedì 5 ottobre

**09.00–09.30**    **Registrazione dei partecipanti**

**09.30–10.00**    Saluto del Presidente S.I.P.I. Dr. Marino Prearo

Saluto delle Autorità

Saluto del Direttore A.P.I. Dr. Andrea Fabris

**10.00–11.15**    **Comunicazioni scientifiche – I sessione (malattie virali)**

Moderatore: Sara Ciulli

Università di Bologna

**10.00-10.15**    **MALATTIA DEL SONNO IN BOSNIA-ERZEGOVINA:  
ASPETTI CLINICI E ANATOMOPATOLOGICI - O1**

Beraldo P., Sarti M., Galeotti M.

**10.15-10.30**    **CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL RHABDOVIRUS  
DEL PESCE GATTO IN ITALIA - O2**

Bedendo G., Panzarin V., Fortin A., Zamperin G., Salogni C., Pascoli F., Toffan A.

**10.30-10.45**    **IMMUNOREATTIVITÀ *IN VITRO* E *IN VIVO* DI DIVERSE  
SPECIE DI *BETANODAVIRUS* - O3**

Pascoli F., Guazzo A., Scapigliati G., Buonocore F., Toffan A.

**10.45-11.00**    **BETANODAVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI:  
CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI CEPPI VIRALI  
CIRCOLANTI IN EUROPA - O4**

Volpe E., Grodzki M., Panzarin V., Guercio A., Purpari G., Serratore P., Ciulli S.

**11.00-11.15**    **APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE ALLO STUDIO  
EPIDEMIOLOGICO DELLA NECROSI PANCREATICA  
INFETTIVA (IPN) NELLE TROTTICOLTURE DEL FRIULI  
VENEZIA GIULIA - O5**

Bille L., Fabris A., Toson M., Ceolin C., Toffan A., Quartesan R., Panzarin V., Casarotto C., Mulatti P., Cocchi M., Vio D., Ferrè N., Manfrin A., Palei M., Dalla Pozza M.

**11.15-11.45**    **Coffee break**



11.45-13.00 **Comunicazioni scientifiche - II sessione (malattie batteriche)**

Moderatore: Amedeo Manfrin  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

11.45-12.00 **SETTICEMIA DA *AEROMONAS SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA* IN PERSICO SPIGOLA (*MORONE CHRYSOPS* X *MORONE SAXATILIS*) D'ALLEVAMENTO - O6**  
Salogni C., Accini A., Borella L., Alborali G.L.

12.00-12.15 **PROVE DI PATOGENICITÀ DI CEPPI DI *VIBRIO HARVEYI* IN BRANZINO - O7**  
Pretto T., Zambon M., Pascoli F., Manfrin A., Fioravanti M.L.

12.15-12.30 **PROVE PRELIMINARI DI MIC (MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE) IN CEPPI DI *YERSINIA RUCKERI* ISOLATI DA CAMPIONI DIAGNOSTICI - O8**  
Fiocchi E., Zambon M., Toson M., Manfrin A.

12.30-12.45 **MOBILITA' IN CEPPI DI *YERSINIA RUCKERI* ISOLATI DA SALMONIDI ED ANTIBIOTICORESISTENZA: DATI PRELIMINARI - O9**  
Sgariglia E., Epifanio E., Valentini A., Marsella A., Ghittino C., Agnetti F.

12.45-13.00 **ESPRESSIONE DEL BIOFILM E DELLA PROTEINA A IN CEPPI DI *AEROMONAS HYDROPHILA* E *AEROMONAS BESTIARUM* ISOLATI IN CORSO DI PATOLOGIA IN SPECIE DULCIACQUICOLE - O10**  
Cocchi M., Deotto S., De Zan G., Dalla Pozza M., Ustulin M.

13.00-14.30 **Pranzo libero**

14.30-17.30 **Comunicazioni scientifiche - III sessione (parassiti)**

Moderatore: Gabriella Gaglio  
Università di Messina

14.30-14.45 **INFESTAZIONE DA NEMATODI IN ESEMPLARI DI CORMORANO COMUNE (*PHALACROCORAX CARBO*) DEL CENTRO E NORD ITALIA -O11**  
Agnetti F., Sgariglia E., Scaglione F.E., Epifanio E., Ghittino C., Marsella A., Valentini A., Caffara M., Gustinelli A., Fioravanti M.L.

- 14.45-15.00 **MOLECULAR IDENTIFICATION OF AMYLOODINIUM OCELLATUM INFECTION IN EUROPEAN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX*) AND EXPRESSION OF IMMUNE-RELATED GENES DURING NATURAL INFECTION - O12**  
Byadgi O., Massimo M., Bulfon C., Beraldo P., Galeotti M., Volpatti D.
- 15.00-15.15 **EFFETTI *IN VITRO* DI 16 COMPOSTI DI ORIGINE VEGETALE SULLA MOTILITÀ DI DINOSPORE DI AMYLOODINIUM OCELLATUM - O13**  
Massimo M., Beraldo P., Bulfon C., Volpatti D., Byadgi O., Galeotti M.
- 15.15-15.30 **GRAVE EPISODIO DI AMYLOODINIOSI IN GIOVANILI DI BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*): ANALISI DEI DETERMINANTI DI MALATTIA E RILIEVI ANATOMOPATOLOGICI - O14**  
Beraldo P., Byadgi O., Massimo M., Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M.
- 15.30-15.45 **INDAGINE ISTOPATOLOGICA. PARASSITOLOGICA E MOLECOLARE DI FORME LARVALI DI CESTODI IN *GALEUS MELASTOMUS* - O15**  
Saitta M., Gaglio G., Manghisi A., Caputo S., Marino F.
- 15.45-16.00 **EFFICACIA *IN VITRO* DI MOLECOLE E PRODOTTI COMMERCIALI NEI CONFRONTI DI *SAPROLEGNIA* SPP. - O16**  
Tedesco P., Galuppi R., Ciardo M.L., Fioravanti M.L.
- 16.00-16.15 **MICROSPORIDIOSI DA *LOMA SALMONAE* (MICROSPORIDIA) IN TROTE IRIDEE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) D'ALLEVAMENTO - O17**  
Quaglio F., Perolo A., Gustinelli A., Fioravanti M.L.
- 16.15-16.45 **Coffee break**
- 16.45-17.00 **STUDIO RETROSPETTIVO SUL RUOLO DELLE TECNICHE DIAGNOSTICHE DI BASE IN ITTIONCOLOGIA - O18**  
Iaria C., Lanteri G., Corti I., Mazzullo G., Marino F.

- 17.00-17.15 **INDAGINE ISTOLOGICA, ULTRASTRUTTURALE E MOLECOLARE IN CARCINOMI SQUAMOCELLULARI DI CARPE KOI - O19**  
Volpe E., Sirri R., Barbè T., Errani F., Lazzari M., Franceschini V., Sarli G., Mandrioli L., Ciulli S.
- 17.15-17.30 **ISTOLOGIA APPLICATA ALLA PATOLOGIA ITTICA: L'ESPERIENZA IZSUM - O20**  
Valentini A., Sgariglia E., Epifanio E., Marsella A., Ghittino C., Manuali E., Agnetti F.
- 17.30-19.00 **Assemblea dei soci**
- 20.30 **Cena sociale**

## Venerdì 6 ottobre

- 08.30-10.00 **Comunicazioni scientifiche - IV sessione (Benessere animale e miscellanea)**

Moderatore: Marino Prearo

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

- 08.30-08.45 **VALUTAZIONE DI NUOVE TECNICHE DI STORDIMENTO (STUNNING) DELLA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) PER RIDURRE LO STRESS IN FASE DI MACELLAZIONE - O21**  
Manfrin A., Fiocchi E., Del Tedesco F., Bertotto D.
- 08.45-09.00 **SVILUPPO DI METODI MOLECOLARI ED ISTOLOGICI PER LA RILEVAZIONE DI BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO IN BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E ORATA (*SPARUS AURATA*) - O22**  
Fiocchi E., Civettini M., Pretto T., Basaglia M., Manfrin A.
- 09.00-09.15 **MACROINVERTEBRATI BENTONICI E CONTAMINAZIONE DA ELEMENTI TRACCIA: UNA POSSIBILE MATRICE PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE DOLCI SUPERFICIALI? - O23**  
Pastorino P., Squadrone S., Bertoli M., Abete M., Prearo M., Pizzul E.

- 09.15-09.30    **EFFETTI DELL'INCLUSIONE DI FARINE D'INSETTO (*HERMETIA ILLUCENS*) SUI BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) - O24**  
Elia A.C., Prearo M., Caldaroni B., Magara G., Dörr A.J.M., Scoparo M., Capucchio M.T., Righetti M., Gai F., Gasco L.
- 09.30-09.45    **RISULTATI DI 10 ANNI DI MONITORAGGIO SANITARIO IN UNO STABILIMENTO FORNITORE ED UTILIZZATORE DI PESCI DA LABORATORIO - O25**  
Di Caro G., Lanteri G., Iaria C., Pecoraro R., Guerrera M.C., Cassata G., Ciulli S., Marino F.
- 09.45-10.00    **LE MALATTIE NELLE OSTRICHE CONCAVE, *CRASSOSTREA GIGAS*, ALLEVATE IN SARDEGNA: I RISULTATI DI UN ANNO DI INDAGINI - O26**  
Mandas D., Antuofermo E., Salati F.
- 10.00-10.30    **PREMIAZIONI**  
Premio SIPI 2017 - Miglior tesi  
Premio miglior presentazione  
Premio miglior poster  
Premio Pietro Ghittino 2017- Miglior giovane ricercatore under 40  
Premio Ettore Grimaldi 2017 - Migliore pubblicazione scientifica di giovani ricercatori under 40  
  
**Chiusura lavori**
- 10.30-11.00    **Coffee break libero**

## POSTER PRESENTATI:

1. **PRIMI EPISODI DI KHV IN CARPE KOI (*CYPRINUS CARPIO* VAR. KOI) NELL'ITALIA NORD-OCCIDENTALE**  
Prearo M., Pastorino P., Angiolillo S., Biosa T., De Marco L., Farina M., Milla F., Scagliotti P., Santi M., Righetti M., Masoero L., Toffan A.
2. **CONCENTRAZIONE DI CAMPIONI DI ACQUA MARINA PER RICERCA DI BETANODAVIRUS**  
Toffan A., Buratin A., Pascoli F.
3. **PRESENZA DI *CRANGON CRANGON* NUDIVIRUS (CCNV) IN GAMBERO GRIGIO (*CRANGON CRANGON*) NELLA LAGUNA DI MARANO**  
Trevisanato R., Pretto T., Quaglio F., Manfrin A.
4. **MORTALITÀ DA RANAVIRUS E *AEROMONAS HYDROPHILA* IN PESCI GATTO**  
Ricci E., Cardeti G., Fioretti M., Bossù T., Cocumelli C., Toffan A., Susini F.
5. **MORTALITÀ DA *AEROMONAS VERONII* BV SOBRIA IN SPIGOLE DI ALLEVAMENTO**  
Susini F., Ricci E., D'Alonzo A., Cocumelli C., Zambon M., Fiocchi E., Pretto T., Francalacci C., Manfrin A.
6. **FENOTIPIZZAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* ISOLATO DA SPECIE ITTICHE ALLEVATE**  
Fiocchi E., Zambon M., Deotto S., Cocchi M., Manfrin A.
7. **UTILIZZO DELLA TECNICA DELLA MICROAGGLUTINAZIONE SU PIASTRA NELLA VALUTAZIONE ANTICORPALE IN SIERO DI TROTE IRIDEA IMMUNIZZATE CONTRO *LACTOCOCCUS GARVIEAE***  
Canola S., Righetti M., Cavazza G., Pastorino P., Arsieni P., Bona M.C., Sicuro B., Prearo M.
8. **SCREENING ELETTROFORETICO IN SIERI DI TROTA IRIDEA D'ALLEVAMENTO: DATI PRELIMINARI**  
Dezzutto D., Canola S., Barbero R., Righetti M., Bergagna S., Gennero M.S., Arsieni P., Pastorino P., Prearo M., Bozzetta E.
9. **PRIMA SEGNALEZIONE DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* IN SALMERINO DI FONTE (*SALVELINUS FONTINALIS*) SELVATICO IN AMBIENTE ALPINO**  
Pastorino P., Santi M., Bertoli M., Righetti M., Di Blasio A., Bona M.C.,

Pizzul E., Prearo M.

10. **UN EPISODIO D'INFEZIONE SISTEMICA DA *SHEWANELLA PUTREFACIENS* GROUP IN CARPE KOI (*Cyprinus carpio*, L.)**  
De Zan G., Deotto S., Di Giusto T., Pascoli F., Toffan A., Cocchi M.
11. **NOTA SU NUOVI PATOGENI DI ORIGINE BATTERICA IN STORIONI D'ALLEVAMENTO**  
Prearo M., Santi M., Pastorino P., Righetti M., Scanzio T., Pedron C., Bona M.C.
12. **FATTORI DI VIRULENZA IN *VIBRIO CHOLERAE* NON O1 E NON O139 E IN *VIBRIO MIMICUS* ISOLATI DA PESCI ORNAMENTALI**  
Zago V., Zambon M., Civettini M., Zaltum O., Manfrin A.
13. **VALUTAZIONE DI PARTE DELLA FLORA BATTERICA INTESTINALE COLTIVABILE IN CICLIDI MBUNA MEDIANTE MALDI-TOF**  
Righetti M., Santi M., Mugetti D., Pastorino P., Esposito G., Piga S., Prearo M.
14. **POTENZIALE TRASFERIMENTO DI *SAPROLEGNIA* SPP. DALL'ALLEVAMENTO ALL'AMBIENTE SELVATICO: RISULTATI PRELIMINARI**  
Galuppi R., Sandoval-Sierra J.V., Cainero M., Menconi V., Tedesco P., Gustinelli A., Diéguez-Uribeondo J., Fioravanti M.L.
15. **STUDIO ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO SULLA REATTIVITÀ BRANCHIALE DEL BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALL'INFEZIONE DA *AMYLODINIUM OCELLATUM***  
Volpatti D., Massimo M., Bulfon C., Beraldo P., Zanolli S., Byadgi O., Ronza P., Magi G.E., Galeotti M.
16. **PRIMA SEGNALAZIONE DI MALATTIA NODULARE BRANCHIALE NELLA TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA* L.)**  
Perolo A., Accini A., Lunelli F., Dalla Pozza M., Gustinelli A., Menconi V., Fioravanti M.L., Quaglio F.
17. **PRESENZA DI *CYSTIDICOLA FARIONIS* IN TROTE IRIDEA ALLEVATE: UN POSSIBILE AMPLIAMENTO DELL'AREALE CONOSCIUTO?**  
Santi M., Cavazza G., Righetti M., Pastorino P., Saragaglia C., Arsieni P., Prearo M.
18. **RUOLO DI *CYSTICOLOIDES EPHEMERIDARUM* (NEMATODA: CYSTICOLIDAE) NELL'ETIOPATOGENESI DI DEFORMITÀ**



**SCHELETRICHE DOCUMENTATE IN TROTE FARIO (*SALMO TRUTTA FARIO*) PROVENIENTI DAL PARCO NAZIONALE DELL'ASPROMONTE**

Scopelliti F., De Benedetto G., Gaglio G., Belvedere A., Belmusto G., Trombetta D., Siclari A., Marino F.

19. **TRIENOFOROSI IN LUCCI (*ESOX LUCIUS*) E PLEROCERCOSI DA *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* IN PESCI PERSICO (*PERCA FLUVIATILIS*) PROVENIENTI DAL MARE DEL NORD**  
Corti I., Colafranceschi I., Gaglio G., Malandra R., Costa A., Marino F.
20. **OLTRE LA BARRIERA TEMPO: RICERCA SULLE INFESTAZIONI DA TREMATODI DIGENEI IN BIVALVI DI ACQUA SALMASTRA DELL'OLOCENE ITALIANO**  
Azzarone M., Scarponi D., Scirocco T., Caffara M., Gustinelli A., Fioravanti M.L.
21. **PRIMA INDAGINE SULLA PRESENZA DI PARASSITI ANISAKIDI IN SPIGOLE ED ORATE D'ALLEVAMENTO COMMERCIALIZZATE E PRODOTTE IN SICILIA**  
Cammilleri G., Costa A., Vella A., Graci S., Buscemi M.D., Collura R., Ganci F., Incardona A., Iannazzo I., Santangelo F., Giangrosso G., Ferrantelli V.
22. **INDAGINE PARASSITOLOGICA SULLA PRESENZA DI STADI LARVALI DI NEMATODI ANISAKIDAE IN PESCI MARINI ALLEVATI IN ITALIA**  
Menconi V., Gustinelli A., Caffara M., Francalacci C., Fioravanti M.L.
23. **PRIMA SEGNALEZIONE DI UN PAPILOMA LABIALE IN UN CICLIDE MBUNA DEL LAGO MALAWI**  
Antuofermo E., Polinas M., Esposito G., Santi M., Piga S., Prearo M.
24. **PAPILOMA IN UN ABRAMIDE (*ABRAMIS BRAMA*, L. 1758) SELVATICO PROVENIENTE DAL DELTA DEL PO**  
De Benedetto G., Capparucci F., Corti I., Iaria C., Malandra R., Marino F.
25. **INDAGINE ISTOPATOLOGICA ED EZIOLOGICA SU LESIONI PAPILOMATOSE RILEVATE IN UNA POPOLAZIONE SELVATICA DI BARBO ITALICO (*BARBUS PLEBEJUS* BONAPARTE, 1839) E BARBO EUROPEO (*BARBUS BARBUS* LINNAEUS, 1758) NEL FIUME ADDA**  
Salogni C., Gibelli L.R., Pigoli C., Lavazza A., Prospero A., Villa R., Ruggeri J., Alborali G.L.

26. **ASPETTI ANATOMOISTOPATOLOGICI INUSUALI DI UN FIBROMA IN MORMORA (*LITHOGNATHUS MORMYRUS* L. 1758) SELVATICA**  
Iaria C., Puleio R., La Cavera E., Fiasconaro M., Valerioti S., Bonasoro I., Marino F.
27. **LESIONI NODULARI PIGMENTATE IN ANELLI DI TOTANO GIGANTE DEL PACIFICO (*DOSIDICUS GIGAS*): L'ASPETTO MORFOLOGICO INGANNA**  
Corti I., Banco B., Tecilla M., Ghisleni G., Malosio M., Ranghieri V., Malandra R.
28. **CASO DI FUSIONE DEGLI EMIPENI IN SQUALO MANZO (*HEPTRANCHIAS PERLO*)**  
Capparucci F., De Benedetto G., Iaria C., Saitta M., Marino F.
29. **REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI IN SCAZZONI (*COTTUS GOBIO*) PRELEVATI IN AMBIENTE LACUSTRE ALPINO**  
Pastorino P., Varello K., Bertoli M., Francese D.R., Abbamonte G., Bozzetta E., Prearo M., Pizzul E.
30. **RILIEVI ISTOLOGICI IN STORIONI SIBERIANI (*ACIPENSER BAERII*) ALIMENTATI CON FARINA DI MOSCA SOLDATO (*HERMETIA ILLUCENS*) A DIVERSO GRADO DI SOSTITUZIONE**  
Varello K., Caimi C., Prearo M., Francese D.R., Santi M., Audino V., Bona M.C., Gai F., Bozzetta E., Gasco L.
31. **VALUTAZIONE EMATOLOGICA SU ESEMPLARI DI GATTUCCIO BOCCANERA (*GALEUS MELASTOMUS*) DEL BASSO TIRRENO**  
Briguglio G., Suraci V., Arfuso F., Cantarella S., Fazio F., Marino F.
32. **OVERVIEW SUGLI EPISODI DI MORTALITÀ DELL'ITTIOFAUNA SELVATICA NEI CORSI D'ACQUA DEL TRIVENETO NEL PERIODO 2011-2016**  
Bille L., Toson M., Ceolin C., Silvagni A., Dalla Pozza M., Manfrin A.
33. **MORTALITÀ ANOMALA DI ITTIOFAUNA SELVATICA CAUSATA DA PIRETROIDI**  
Bille L., Binato G., Gabrieli C., Manfrin A., Pascoli F., Pretto T., Toffan A., Dalla Pozza M., Angeletti R., Arcangeli G.
34. **POLIBROMODIFENILETERI (PBDE) IN PESCI DEL MAR LIGURE: DATI PRELIMINARI**  
Squadrone S., Piersanti A., Tavoloni T., Scortichini G., Menotta S., Fedrizzi G., Ferrari A., Prearo M., Abete M.C.

35. **INDAGINE PRELIMINARE SULL'ACCUMULO DI METALLI PESANTI NELLA VONGOLA VERACE AUTOCTONA *Ruditapes decussatus* IN ALCUNE ZONE UMIDE DELLA SARDEGNA**  
Esposito G., Prearo M., Antuofermo E., Meloni D., Pais A., Pastorino P., Abete M.C., Squadrone S.
36. **PROGETTO VETBIONET: VETERINARY BIOCONTAINED FACILITY NETWORK FOR EXCELLENCE IN ANIMAL INFECTIOLOGY RESEARCH AND EXPERIMENTATION**  
Toffan A., Pascoli F., VetBioNet-Consortium
37. **SVILUPPO INTEGRATO ACQUACOLTURA NEL MEDITERRANEO: IL PROGETTO MEDAID**  
Toffan A., Dalla Pozza M., Panzarin V., Pascoli F., Bille L., MEDAID-Consortium
38. **WIN-FISH: BENESSERE, SALUTE E INDIVIDUALITA' NELLE SPECIE ITTICHE ALLEVATE**  
Fiocchi E., Manfrin A., Winberg S., Bégout M.L, Roque A., Villarroel M., Lembo G., Gesto M.

# Workshop ECM

## Problematiche tecniche e sanitarie delle avannotterie marine

10.30-11.00 Registrazione dei partecipanti

11.00-11.30 Saluto delle Autorità

11.30-13.00 **Sessione 1**

Moderatori: Maria Letizia Fioravanti - Università degli Studi di Bologna  
Andrea Fabris - Associazione Piscicoltori Italiani

11.30-12.00 Marco Gilmozzi  
Presidente FEAP - Vice presidente API  
*QUALI ESIGENZE GENERA IL MERCATO EUROPEO/  
MEDITERRANEO PER UNA MARICOLTURA MODERNA?*

12.00-12.30 Massimo Caggiano  
Panittica Italia Società Agricola Srl  
*NECESSITÀ ATTUALI E FUTURE DELLE AVANNOTTERIE  
MARINE*

12.30-13.00 Alessio Bonaldo  
Università degli Studi di Bologna  
*ALIMENTAZIONE DEGLI STADI LARVALI: LA NUOVA SFIDA*

13.00-14.00 **Light lunch**

14.00-17.30 **Sessione 2**

Moderatori: Maria Letizia Fioravanti - Università degli Studi di Bologna  
Andrea Fabris - Associazione Piscicoltori Italiani

14.00-14.30 Jordi López Ramon  
Direttore ADS ACUIVAL, Spain  
*BIOSICUREZZA IN AVANNOTTERIA MARINA  
BIOSECURITY IN THE HATCHERY*

14.30-15.00 Isabel Bandin  
Universidad de Santiago de Compostela, Spain

*BETANODAVIRUS IN AVANNOTTERIA  
BETANODAVIRUS IN THE HATCHERY*

15.00-15.30 **Coffee break**

15.30-16.00 Panagiotis Varvarigos  
AQUAHEALTH Diagnostic Services and Health Management  
Support, Greece  
*PROTOCOLLI VACCINALI E NUOVE SFIDE PER LA PROFILASSI  
VACCINES AND NEW THERAPEUTICS IN THE HATCHERY*

16.00-16.30 Discussione

16.30-17.30 Valutazione dell'apprendimento: questionario a risposta multipla  
Compilazione questionario di gradimento

# ABSTRACT

## Comunicazioni orali



## MALATTIA DEL SONNO IN BOSNIA-ERZEGOVINA: ASPETTI CLINICI E ANATOMOPATOLOGICI

Beraldo P.<sup>1\*</sup>, Sarti M.<sup>2</sup>, Galeotti M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Sez. di Scienze Animali e Veterinari, Università di Udine. <sup>2</sup> Veterinario Skretting

L'alfavirus dei salmonidi è responsabile della malattia del pancreas nel salmone atlantico (Pancreatic Disease-PD) e della malattia del sonno nella trota iridea (Sleeping Diseases-SD), le quali sono facilmente trasmissibili e possono causare notevoli perdite. L'eziologia virale di queste malattie è stata accertata più vent'anni fa (nel 1976 per la PD e nel 1994 per la SD) e il virus è stato il primo *Alphavirus* (famiglia Togaviridae) a essere isolato in trote malate. Gli stati dell'Europa continentale sono interessati soltanto dalla SD, dove è stata sicuramente segnalata in Svizzera, Francia, Germania, Spagna, Croazia e Italia. Tuttavia, la SD non rappresenta un rischio sanitario preminente per l'allevamento della trota iridea, poiché, in Italia come negli altri stati europei interessati, la mortalità è in genere trascurabile, sebbene, in alcuni casi, possa superare il 20% (Boucher *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 2003). In quest'ottica, si ritiene interessante descrivere alcuni aspetti clinici e anatomopatologici di malattia del sonno verificatasi negli ultimi tre anni in un allevamento in Bosnia-Erzegovina. L'allevamento è alimentato da acqua di fiume, con temperatura di 8-9°C costante tutto l'anno, nel quale, negli ultimi anni, sono state introdotte diverse specie ittiche (trota iridea, trota fario e temolo) per la pesca sportiva. Nel 2015 si è verificato il primo episodio di SD, caratterizzato da un quadro clinico e un andamento della malattia in linea con quanto descritto in letteratura, anche in termini di classe di età maggiormente sensibile (2-15 g), mortalità e lesioni anatomopatologiche. Nei due anni successivi (soprattutto nel 2017) la situazione si è notevolmente aggravata, con tasso di mortalità medio del 60% e picchi fino all'80%, quadri clinici non completamente sovrapponibili a quelli descritti in letteratura (l'atassia motoria si manifesta come incoordinazione natatoria piuttosto che l'atteggiamento dormiente e manca la tipica colorazione bluastro) e severe lesioni anatomopatologiche. Il quadro istologico è, infatti, caratterizzato da grave e diffusa necrosi del pancreas esocrino (con conseguente atrofia pancreatica e, quindi, inibizione della funzione digestiva), del tessuto linfoide (milza e rene anteriore) e dei cardiomiociti (atrio e ventricolo) che, tipicamente, appaiono eosinofili, con il citoplasma coartato e il nucleo picnotico. Negli episodi più recenti, diffuse necrosi focali epatiche completano il quadro, mentre le lesioni muscolari sono poco apprezzabili.

Questi episodi di SD, oltre a rappresentare la prima descrizione della malattia in Bosnia-Erzegovina, illustrano un quadro di malattia più grave rispetto ad altri contesti geografici per l'impatto sulla produzione zootecnica dell'allevamento, e ponendo dei quesiti epidemiologici sulla gestione sanitaria dell'impianto.

Boucher P., Castric J. & Baudin Laurencin F. (1994). Observation of virus-like particles in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with sleeping disease virulent material. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14: 215-216.

Graham D.A., Rowley H.M., Walker I.W., Weston J.H., Branson E.J. & Todd D. (2003). First isolation of sleeping disease virus from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *J. Fish Dis.*, 26: 691-694.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL RHABDOVIRUS DEL PESCE GATTO IN ITALIA

Bedendo G.<sup>1</sup>, Panzarin V.<sup>1</sup>, Fortin A.<sup>1</sup>, Zamperin G.<sup>1</sup>, Salogni C.<sup>2</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia (BS).

A seguito dell'identificazione del Rhabdovirus del pesce gatto (Ictalurid Rhabdovirus - IcRV) isolato durante un grave episodio di mortalità di *Ameiurus melas* verificatosi nel 2016, si è proceduto alla sua caratterizzazione molecolare, unitamente ad altri 14 virus isolati nella medesima specie nel corso di episodi di mortalità simili avvenuti dal 1993 ad oggi.

L'isolato 16ITT-V/75 precedentemente descritto da Bedendo *et al.* (2016), è stato sottoposto a Whole Genome Sequencing (WGS) utilizzando la tecnologia Illumina® MiSeq. La sequenza del genoma completo è stata ottenuta mediante *de novo assembly* ed annotata utilizzando come riferimento la sequenza completa del Rhabdovirus della tinca (TenchRV), il genoma più simile a 16ITT-V/75 presente in GenBank. La sequenza consenso generata ha una lunghezza di 11.086 bp ed è costituita da cinque open reading frames (ORF) con segnale di start 3'-UUGUC-5' e segnale di stop/polyA 3'-AUAC(U)7-5', e intervallate da brevi sequenze intergeniche. Le ORFs identificate codificano per le classiche proteine dei Rhabdovirus nell'ordine: 3'- nucleoproteina (N), fosfoproteina (P), proteina di matrice (M), glicoproteina (G) e RNA polimerasi (L) – 5'.

Al fine di classificare i virus isolati da pesce gatto all'interno della famiglia *Rhabdoviridae*, per ciascun isolato è stata ottenuta la sequenza parziale del gene N (670 bp) (Talbi *et al.*, 2011) e la sequenza completa del gene G (1630 bp). Le sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche dedotte sono state sottoposte ad analisi filogenetica mediante metodo maximum likelihood (ML). I risultati ottenuti indicano che i IcRV appartengono al genere *Sprivivirus* e presentano la più alta similarità nucleotidica (gene N: 97%; gene G: 98%) con TenchRV. Le sequenze nucleotidiche degli isolati italiani presentano tra loro una scarsa variabilità genetica (100-99,5% di identità per il gene N e 100-98,6% di identità per il gene G). Le sequenze aminoacidiche dedotte della glicoproteina confermano una percentuale di identità elevata tra i ceppi analizzati (100-99%).

E' interessante notare che uno degli isolati di pesce gatto identificato all'esame virologico come Rhabdovirus, risultava negativo alle RT-PCR per l'amplificazione del gene G degli IcRV descritte nel presente lavoro. Questo ceppo è stato poi caratterizzato sulla base della sequenza parziale del gene N come SVCV. Il pesce gatto è infatti suscettibile anche ad infezione da parte di SVCV (OIE 2017). Risulta pertanto estremamente importante la corretta caratterizzazione genetica dei Rhabdovirus che infettano il pesce gatto poiché la sola identificazione su base virologica può essere difficile.

La produzione di pesce gatto in Italia è crollata drasticamente negli ultimi anni passando da 600 t a meno di 200 t (FEAP 2016) a causa delle perdite economiche inflitte a questo settore produttivo dalle virosi. Implementare i metodi diagnostici e le conoscenze relative alla patogenesi di queste malattie può portare sicuramente giovamento a questo delicato settore.

Bedendo *et al.* (2016). Isolamento e caratterizzazione di Rhabdovirus da un grave episodio di mortalità in pesce gatto. *Atti del XXII Convegno Nazionale SIPI*: 13.

Talbi *et al.* (2011). Genetic diversity of perch rhabdoviruses isolates based on the nucleoprotein and glycoprotein genes. *Arch. Virol.*, 156(12): 2133-2144.

OIE (2017). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - chapter 2.3.9. Spring Viremia of carp.

*Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute RC IZSve 08/16*

## IMMUNOREATTIVITÀ *IN VITRO* E *IN VIVO* DI DIVERSE SPECIE DI *BETANODAVIRUS*

Pascoli F.<sup>1\*</sup>, Guazzo A.<sup>2</sup>, Scapigliati G.<sup>3</sup>, Buonocore F.<sup>3</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 35020 Legnaro (PD), Italy; <sup>2</sup> Università degli Studi di Padova, 30100 Padova, Italy; <sup>3</sup> Università della Tuscia, Dipartimento DIBAF, 01100 Viterbo, Italy

Il *Betanodavirus* è l'agente eziologico dell'encefalo-retinopatia virale (ERV), una delle più importanti patologie virali per l'acquacoltura marina, specialmente per la spigola (*D. labrax*). In Europa, sono state descritte 3 specie virali: Striped jack-, Redspotted grouper- e Barfin flounder nervous necrosis virus (SJNNV, RGNNV e BFNNV), ma poco si conosce delle loro proprietà antigeniche. Le due specie parentali SJNNV e RGNNV possono inoltre riassortare in RGNNV/SJNNV e SJNNV/RGNNV.

Studi recenti indicano che le specie SJNNV e RGNNV sono antigenicamente differenti, e appartengono ai sierotipi A e C, rispettivamente. I riassortanti naturali RGNNV/SJNNV e SJNNV/RGNNV sono inseriti nei sierogruppi A e C, rispettivamente, indicando che la proteina del capsido codificata dall'RNA2 si comporta come determinante immunogenico.

Lo scopo del presente lavoro è quello di verificare la cross-protezione *in vivo* di queste due specie virali in spigola mediante l'utilizzo di vaccini RGNNV e SJNNV prodotti in laboratorio.

Dieci ml di RGNNV (isolato 283.2009) e SJNNV (isolato 484.2.2009) sono stati inattivati con 1% di formalina tamponata per una settimana a temperatura ambiente. Due gruppi di 60 spigole sono stati immunizzati IP con 0,1 ml/pesce di virus inattivato. Un ulteriore gruppo di 60 spigole è stato trattato con iniezione IP di 0,1 ml/pesce di PBS 0,01 M a scopo di controllo.

Dopo 30 giorni dalla vaccinazione, a 10 pesci per ciascuna vasca è stato prelevato il sangue per le analisi immunologiche. I restanti pesci sono stati infettati IM con 0,1 ml/pesce di una soluzione di RGNNV (283.2009) e mantenuti a 25°C per 28 giorni. Considerando che la spigola è una specie poco suscettibile a SJNNV, il challenge è stato effettuato solo con RGNNV.

La sopravvivenza a fine periodo per ogni gruppo trattato è stata calcolata e comparata tramite analisi statistica. I risultati mostrano un RPS di 81,2 per i pesci vaccinati con RGNNV inattivato, mentre quelli vaccinati con SJNNV inattivato hanno fatto registrare un RPS di 25,3, confermando la bassa cross-reattività delle due specie virali.

Le analisi sierologiche hanno evidenziato una buona presenza di anticorpi nei pesci vaccinati con RGNNV e SJNNV rilevati tramite test ELISA contro il genotipo omologo, mentre la sieroconversione è stata significativamente più bassa contro il genotipo eterologo, confermando quindi i risultati ottenuti dal challenge.

Poiché nel Mediterraneo circolano diverse specie virali, compresi i ceppi riassortanti, i dati ottenuti da questo studio possono rivelarsi molto informativi per lo sviluppo di vaccini.

*Il presente studio è stato finanziato dal Progetto Europeo EU 7FP TARGETFISH (Grant Agreement 311993) e dal Ministero Italiano della Salute (RC 02/14).*

## BETANODAVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI: CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI CEPPI VIRALI CIRCOLANTI IN EUROPA

Volpe E.<sup>1\*</sup>, Grodzki M.<sup>1</sup>, Panzarin V.<sup>2</sup>, Guercio A.<sup>3</sup>, Purpari G.<sup>3</sup>, Serratore P.<sup>1</sup>, Ciulli S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Cesenatico (FC); <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo (PA)

I Betanodavirus sono virus a ssRNA appartenenti alla famiglia *Nodaviridae*. Il genoma virale è composto da due molecole, l'RNA1 e l'RNA2 che codificano rispettivamente per l'RNA polimerasi RNA-dipendente e per la proteina del capsido. Sulla base della sequenza variabile dell'RNA2, possono essere suddivisi in 4 specie denominate Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) e Redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV). I Betanodavirus sono responsabili dell'Encefalo retinopatia virale (ERV), malattia che causa ingenti perdite economiche nell'allevamento di numerose specie ittiche marine incluso il branzino europeo (*Dicentrarchus labrax*). Inoltre, questi virus sono stati sporadicamente ritrovati anche in invertebrati, i quali sembra rivestano un ruolo di possibili carrier. Recenti indagini, infatti, dimostrano che alcuni molluschi bivalvi sono capaci di accumulare e rilasciare particelle virali infettanti di Betanodavirus (Volpe *et al.*, 2017).

Questo studio ha l'obiettivo di caratterizzare i Betanodavirus ritrovati in molluschi bivalvi in Europa. In totale, 28 nuovi ceppi virali sono stati rinvenuti nel corso di due monitoraggi: la prima indagine, svolta dal 2009 al 2012, ha permesso di evidenziare Betanodavirus in 3 differenti specie di molluschi bivalvi quali la vongola verace (*Ruditapes philippinarum*) ( $n = 9$ ), l'ostrica concava (*Crassostrea gigas*) ( $n = 6$ ) ed i mitili (*Mytilus galloprovincialis*) ( $n = 1$ ), provenienti da Italia, Spagna o Francia (Grodzki *et al.*, 2010). La seconda indagine, invece, si è focalizzata su campioni di vongola verace provenienti dall'Italia raccolti fra il 2014 ed il 2015 ( $n = 11$ ). Infine, 1 ceppo virale è stato isolato da mitili presso l'IZS della Sicilia nel 2008.

I 28 nuovi ceppi di Betanodavirus sono stati caratterizzati geneticamente tramite amplificazione, sequenziamento e analisi filogenetica (metodo Maximum likelihood) della sequenza parziale dell'RNA2. Per una selezione di ceppi si è inoltre proceduto all'analisi di una porzione dell'RNA1 ( $n = 9$ ). Le sequenze ottenute dai ceppi ritrovati in molluschi bivalvi sono state comparate con una selezione rappresentativa di virus isolati tra il 1995 ed il 2013 nel bacino del Mediterraneo (Panzarin *et al.*, 2012). L'indagine ha rivelato una elevata similarità genetica tra i ceppi ritrovati nei molluschi bivalvi e quelli isolati da numerose specie ittiche, sia selvatiche che allevate nel bacino del Mediterraneo. L'analisi inoltre non ha evidenziato alcuna correlazione tra clusterizzazione genetica, origine geografica e specie ospiti dei ceppi virali identificati nei molluschi bivalvi. Da notare che tutti i Betanodavirus ritrovati nei molluschi bivalvi appartengono alla specie RGNNV, ad eccezione di un ceppo che si differenzia chiaramente da tale specie e potrebbe rappresentare una nuova specie di Betanodavirus o, quanto meno, un nuovo sottogruppo della specie RGNNV.

In conclusione è stata evidenziata una presenza frequente e variegata di Betanodavirus in molluschi bivalvi e uno scenario epidemiologico sovrapponibile a quello osservato nei pesci nello stesso areale. Questi dati sottolineano il possibile ruolo di carrier dei molluschi bivalvi e suggeriscono un loro possibile utilizzo come bio-indicatori dello stato di infezione delle aree destinate all'allevamento di specie sensibili.

Grodzki M., Bignami G., Serratore P. & Ciulli S. (2010). Ritrovamento di Betanodavirus in molluschi bivalvi e analisi molecolare dei ceppi evidenziati. *Abstract book XVI Convegno SIPI*: 28.

Panzarin V., Fusaro A., Monne I., Cappellosa E., Patarnello P., Bovo G. & Cattoli G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of Betanodavirus in southern Europe. *Infect. Genet. Evol.*, 12: 63-70.

Volpe E., Pagnini N., Serratore P. & Ciulli S. (2017). Fate of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) in experimentally challenged Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Dis. Aquat. Org.*, 125(1): 53-61.

## **APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE ALLO STUDIO EPIDEMIOLOGICO DELLA NECROSI PANCREATICA INFETTIVA (IPN) NELLE TROTECOLTURE DEL FRIULI VENEZIA GIULIA**

Bille L.<sup>1\*</sup>, Fabris A.<sup>2</sup>, Toson M.<sup>1</sup>, Ceolin C.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>, Quartesan R.<sup>1</sup>, Panzarin V.<sup>1</sup>, Casarotto C.<sup>1</sup>, Mulatti P.<sup>1</sup>, Cocchi M.<sup>1</sup>, Vio D.<sup>1</sup>, Ferrè N.<sup>1</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Palei M.<sup>3</sup>, Dalla Pozza M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; <sup>2</sup>Associazione Piscicoltori Italiani; <sup>3</sup>Regione Friuli Venezia Giulia, Servizio sanità pubblica veterinaria

L'Italia è il primo produttore di salmonidi d'acqua dolce tra i paesi dell'Unione Europea. Il 65% della produzione nazionale è concentrata nelle regioni del Nord-Est e il 30% delle trote iridee allevate in Italia provengono dal Friuli Venezia Giulia (FVG). La Necrosi Pancreatica Infettiva (IPN) è una delle più importanti malattie virali tra quelle che colpiscono gli allevamenti di trote, determinando importanti perdite economiche a causa dell'elevata mortalità che essa provoca in allevamento, soprattutto in avannotteria. In letteratura si trovano molte informazioni relative agli aspetti clinici ed epidemiologici della malattia negli allevamenti di salmone atlantico nel Nord Europa, ma non riguardanti le trote allevate sul territorio Italiano. Il presente lavoro si propone di ampliare le conoscenze in merito alla diffusione, anche dal punto di vista spaziale, dell'IPN nelle trotecolture del FVG, di valutare le caratteristiche genetiche del virus e identificare i principali fattori di rischio associati alla sua diffusione.

Sono state quindi campionate le trotecolture friulane intensive in attività all'avvio del progetto (n=51) e, per ognuna di esse, sono state raccolte informazioni epidemiologiche e geografiche quali le coordinate dell'azienda e dei relativi punti di captazione e scarico dell'acqua. I campioni raccolti sono stati testati in screening con RT-PCR e, se positivi, con l'isolamento virale, successiva caratterizzazione molecolare e analisi filogenetica. Contemporaneamente sono stati valutati: la prevalenza dell'infezione, i possibili fattori di rischio mediante analisi multivariata e l'eventuale presenza/distribuzione di cluster di allevamenti infetti attraverso l'applicazione di metodiche classiche di analisi spaziale.

La prevalenza del virus nelle trotecolture del FVG è risultata pari al 39%. Non è stata evidenziata alcuna associazione significativa tra la presenza dell'infezione in azienda e fattori di rischio quali la vicinanza ad altri allevamenti o alla possibile diffusione del virus attraverso l'acqua. L'analisi spaziale conferma l'assenza di cluster significativi di allevamenti positivi. La caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati suggerisce anch'essa l'assenza di connessioni epidemiologiche dirette ed esclusive tra le aziende del FVG, ma piuttosto la probabile esistenza di continui flussi virali tra le diverse trotecolture del territorio, compatibile con uno stato di endemia della malattia. In generale, comunque, si riscontra una scarsa variabilità genetica tra virus isolati negli ultimi 40 anni in Italia, che appartengono tutti allo stesso genogruppo.

L'unico fattore di rischio di esposizione al virus da parte delle aziende per il quale è stato possibile identificare un'associazione positiva statisticamente significativa (p-value=0.0382) con l'essere infetto per IPN è la condivisione di mezzi con altre aziende per effettuare il trasporto degli animali (OR=7.29; 95%IC=1.11 - 47.74).

I risultati ottenuti sottolineano quindi ancora una volta il ruolo delle movimentazioni animali nella diffusione delle patologie virali nelle trotecolture. Lo studio dovrebbe essere ampliato per consentire l'analisi della situazione epidemiologica e i relativi fattori di rischio in altre aree a vocazione trotecola, così da poter confrontare i risultati fra regioni caratterizzate da distribuzione territoriale e relazioni idrogeologiche delle aziende differenti. Allo stato attuale quindi, è essenziale l'applicazione delle fondamentali misure di biosicurezza, in particolare la disinfezione dei mezzi di trasporto e l'acquisto di uova e avannotti certificati esenti dalla patologia, per limitare la diffusione della malattia.

*Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute RC 17/13*

## SETTICEMIA DA *AEROMONAS SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA* IN PERSICO SPIGOLA (*MORONE CHRYSOPS* X *MORONE SAXATILIS*) D'ALLEVAMENTO

Salogni C.<sup>1\*</sup>, Accini A.<sup>2</sup>, Borella L.<sup>1</sup>, Alborali G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia; <sup>2</sup> Skretting Italia SpA, Mozzecane, Verona.

Nel presente lavoro viene descritto un focolaio d'infezione da *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* in persico spigola noto anche come hybrid striped bass (*M. chrysops* x *M. saxatilis*). L'episodio si è verificato tra febbraio e maggio del 2017, in una piscicoltura alimentata da acque risorgive alla temperatura di 14-15°C del Nord Italia e caratterizzato da una mortalità giornaliera media del 0,5% circa, protrattasi ininterrottamente per circa tre mesi, raggiungendo un valore cumulativo di quasi il 50%. L'intera partita di pesci (circa 120.000 soggetti), del peso medio di 300 g, era stata introdotta da un altro allevamento alimentato da acqua di fiume circa 2 mesi prima l'inizio dell'episodio di mortalità. In una prima fase la sintomatologia era caratterizzata da apatia, dispnea, grave inappetenza, melanosi cutanea sulla quale spiccava una punteggiatura bianca che veniva riferita ad Ittiotiriosi. Successivamente, nell'arco di circa un mese, l'episodio evolveva clinicamente con comparsa di emorragie ed ulcere cutanee diffuse, unitamente ad un aumento di mortalità. Circa dieci pesci, tra quelli con lesioni più evidenti, venivano quindi campionati e inviati al laboratorio di analisi per essere sottoposti ad accertamenti anatomopatologici, parassitologici e culturali. L'esame autoptico evidenziava emorragie ed ulcere cutanee di varia gravità ed estensione, lesioni oculari (esoftalmo ed oftalmite) e branchiali (ipermucosità ed emorragie), emorragie viscerali, congestione e aumento di volume della milza, distensione della vescica natatoria per accumulo di gas. Gli esami parassitologici (a fresco su impronta e striscio d'organo: cute, branchie ed intestino) rilevavano la presenza di una lieve infestazione protozoaria da *Ichthyophthirius multifiliis* da cute e branchie. L'esame culturale, eseguito su terreni di primo isolamento (agar sangue e TSA), permetteva l'isolamento di colonie in purezza da tutti i visceri in tutti i soggetti analizzati (forma setticemica). Queste erano caratterizzate da un color bianco-crema, diametro massimo dopo 48-72 ore d'incubazione di 2-3 millimetri, aspetto liscio, piatto e rotondo con margini netti e da un alone di emolisi. Su TSA è stato possibile valutare la presenza di una pigmentazione bruna a partire da 48h di incubazione. La colorazione di Gram evidenziava dei coccobacilli Gram negativi. La tipizzazione del germe isolato come è stata eseguita tramite caratterizzazione biochimica (macrometodo, sistemi miniaturizzati API20NE (V8.0), API20E (V5.0), metagenomica (analisi del gene 16S rRNA) e sierologica (agglutinazione rapida).

La fenotipizzazione con macrometodo similmente al sistema miniaturizzato API20NE ha consentito una chiara e precisa identificazione del microrganismo in oggetto come *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, dimostrandosi più specifico rispetto all'API 20E che lo ha invece tipizzato come *A. salmonicida* ssp. *masoucida/achromogenes* (% ID 64,1). L'esame sierologico, che ha previsto l'utilizzo di due distinti antisieri per *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Mono AS – Bionor, Siero Policlonale 2999/1976 - IZSLER) in test di agglutinazione rapida su vetrino, ha evidenziato in entrambi i casi una agglutinazione specifica. L'indagine genetica indipendentemente dalla banca dati utilizzata (Microseq e gene bank BLAST) pur identificando *Aeromonas salmonicida* non hanno permesso di differenziare la sottospecie. Il microrganismo isolato è stato quindi sottoposto a saggio di sensibilità antibiotica con metodica Kirby-Bauer. Sulla base di quest'ultima, il trattamento terapeutico iniziato con mangime antibiotato con ossitetraciclina, è stato sostituito dapprima con sulfamidico potenziato e quindi con flumequina senza dare tuttavia risultati apprezzabili. Tale inefficacia è stata imputata alla pressoché totale inappetenza dei pesci. Solo il trasferimento dello stock ittico in acque più calde (18-20 °C) ha determinato uno spontaneo miglioramento della sintomatologia e rapida diminuzione della mortalità fino alla completa risoluzione del focolaio. Sebbene l'infezione da *A. Salmonicida* ssp. *salmonicida* sia stata già descritta nel persico spigola, è tuttavia rara ed i lavori scientifici a tal riguardo sono pochi. Il presente studio va quindi ad arricchire tale casistica e rappresenta la prima segnalazione della patologia per tale specie sul territorio nazionale.



## PROVE DI PATOGENICITÀ DI CEPPI DI *VIBRIO HARVEYI* IN BRANZINO

Pretto T.<sup>1,3\*</sup>, Zambon M.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>2</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Fioravanti M.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Centro Specialistico Ittico – Adria (RO); <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - CSI –Legnaro (PD); <sup>3</sup> Dip. Scienze Mediche Veterinarie - Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)

*Vibrio harveyi* è una specie patogena emergente per l’acquacoltura marina a livello globale. In ambito europeo e mediterraneo questa specie sta acquisendo importanza nell’allevamento di pesci piatti (*Psetta* sp., *Solea* sp.) e del branzino (*Dicentrarchus labrax*). In *D. labrax* *V. harveyi* è stato isolato in episodi di mortalità, durante le fasi di ingrasso (40-160 gr), caratterizzati da atassia natatoria, anoressia, lesioni cutanee e cheratiti. Lo sviluppo di un vaccino proteggente contro l’infezione da *Vibrio harveyi* risulta interessante per gli allevatori sia nella fase di grow-out che nella stabulazione in avannotteria. In quest’ottica è stato approntato un protocollo sperimentale per valutare la patogenicità di differenti ceppi di *V. harveyi* in branzino e successivamente attuare prove di efficacia vaccinale. Tale protocollo è stato valutato ed approvato dal Ministero della Salute (Direzione Generale Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, Ufficio VI) con autorizzazione n° 776/2015-PR. Le prove di infezione sono state condotte presso l’acquario sperimentale IZSve (Legnaro). I branzini sono stati acquistati ad una taglia di circa 2 g, non vaccinati per *V. anguillarum*-*V. ordalii*. Le prove di infezione sono state attuate in vasche tronco-coniche (250 l), dotate di filtro esterno e UV dedicato, ad una temperatura di 24°C e salinità di 33‰. Sono stati inizialmente testati 10 ceppi di *V. harveyi*, con caratteristiche fenotipiche differenti, isolati in episodi di mortalità in *D. labrax*, mediante somministrazione intra peritoneale e immersione, per valutarne la virulenza in vivo. I 4 ceppi più patogeni sono stati successivamente testati per determinare la dose in grado di causare mortalità nel 70% degli esemplari (Lethal Dose70), mediante somministrazione i.p. (5 concentrazioni differenti:  $3 \times 10^3$  -  $3 \times 10^7$  ufc/soggetto) e per immersione (2 concentrazioni:  $1 \times 10^8$  ufc/ml;  $1 \times 10^9$  ufc/ml) in branzini di 5 g (12 esemplari per prova). Un solo ceppo ha evidenziato mortalità per immersione. In tutti gli esemplari venuti a morte è stato possibile re-isolare *V. harveyi* da encefalo e rene cefalico.

Nelle prove condotte mediante inoculo i.p. la mortalità si è evidenziata a partire dalle 12-16 ore post-infezione concludendosi in 72-96 ore. Gli esemplari presentavano apatia, melanosi, iperventilazione, morendo a poche ore dalla comparsa dei segni clinici, generalmente con facies asfittica (opercoli dilatati). In alcuni casi si osservavano sintomi neurologici con atassia e nuoto a spirale. L’esame autoptico ha evidenziato costantemente grave enterite sierocattarrale con marcata dilatazione del lume intestinale (tratto prossimale) e grave congestione encefalica. L’esame istologico eseguito su soggetti preagonici ha evidenziato setticemia, con presenza di colonie batteriche in tutti gli organi parenchimosi, ed encefalite. L’intestino prossimale presentava distacco della mucosa e colonie batteriche evidenti nella sottomucosa e nei vasi associati. L’epitelio gastrico e rettale appariva conservato. Negli esemplari infettati per immersione la mortalità compariva a partire dalle 24 ore ed era più dilazionata. Si osservavano lesioni cutanee con desquamazione, ulcere dermiche con esposizione della muscolatura, cheratite ed enterite sierocattarrale. Istologicamente si confermava la presenza di dermatite e miosite batterica con diffusione setticemica ed encefalite. Un protocollo IHC è stato standardizzato applicando un siero policlonale ottenuto mediante l’immunizzazione ripetuta di un coniglio SPF con inoculo di 3 ceppi virulenti di *V. harveyi*. Il siero è stato applicato ad una diluizione 1:2000, con buoni risultati.

## PROVE PRELIMINARI DI MIC (MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE) IN CEPPI DI *YERSINIA RUCKERI* ISOLATI DA CAMPIONI DIAGNOSTICI

Fiocchi E.<sup>1\*</sup>, Zambon M.<sup>1</sup>, Toson M.<sup>2</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro di Referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei - CSI Via L. Da Vinci 39, 45011 Adria (RO); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - SCS4 Epidemiologia Veterinaria – Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD).

*Yersinia ruckeri*, Gram negativo delle Enterobacteriaceae, è l'agente eziologico della bocca rossa, malattia riportata in diverse specie ittiche, soprattutto nei salmonidi e in particolare nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). È un patogeno ancora molto frequente negli allevamenti e spesso si utilizzano diversi antibiotici per contrastare la sua presenza e cercare di ridurre la mortalità nei soggetti infettati. Le ultime linee guida della Commissione Europea per l'uso prudente di antimicrobici in medicina veterinaria incoraggiano, ove possibile, l'utilizzo di test di sensibilità antimicrobica prima di iniziare il trattamento. Per questo motivo il Centro Specialistico Ittico (CSI) sta mettendo a punto la MIC (Minima Concentrazione Inibente), nei confronti dei principali patogeni batterici, di diverse molecole antibiotiche utilizzabili nel settore dell'acquacoltura, in accordo alle linee guida della Direzione Operativa Diagnostica Generale – Centro di referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRAB), dell' EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) e del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Attualmente in acquacoltura esistono solo linee guida prodotte dal CLSI per *Aeromonas salmonicida* e ben pochi studi riferiti alle altre specie batteriche patogene per i pesci.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di determinare la MIC<sub>50</sub>, la MIC<sub>90</sub> ed eventualmente gli epidemiological breakpoints di alcune sostanze antibiotiche nei confronti di *Yersinia ruckeri* e predisporre una procedura operativa utilizzabile dagli altri laboratori nazionali che si occupano di diagnosi delle patologie ittiche. Partendo dalla linee guida prodotte dal CLSI per i batteri presenti nelle specie animali omeoterme, si è deciso di utilizzare delle piastre a 96 pozzetti della ditta Merlin predisposte per Enterobacteriaceae Gram negativi con 10 molecole antibiotiche (ampicillina, apramicina, colistina, enrofloxacin, florfenicolo, flumechina, gentamicina, aminosidina, tetraciclina e sulfamidico potenziato) a diverse concentrazioni.

Sono stati testati 50 ceppi di *Yersinia ruckeri*: uno di referenza (NCIMB 1315) e 49 isolati da diversi allevamenti durante il corso degli ultimi 10 anni e conservati presso la ceppoteca del CSI. Dai risultati ottenuti si è proceduto con un'analisi statistica per determinare se i range di concentrazione delle molecole testate siano validi per una corretta valutazione della sensibilità/resistenza dei ceppi in esame, la MIC<sub>50</sub> e la MIC<sub>90</sub> e se vi siano differenze significative di resistenza o sensibilità antibiotica dei ceppi testati.

In futuro si procederà con ulteriori studi su altri patogeni ittici appartenenti ai generi *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Lactococcus* per ottenere gli epidemiological breakpoints e le MIC più corrette per poter effettivamente considerare i ceppi batterici isolati nell'ambito di episodi clinici realmente sensibili o resistenti ai principi attivi autorizzati in Italia per le specie ittiche allevate.

## MOBILITÀ IN CEPPI DI *YERSINIA RUCKERI* ISOLATI DA SALMONIDI ED ANTIBIOTICORESISTENZA: DATI PRELIMINARI

Sgariglia E.<sup>1\*</sup>, Epifanio E.<sup>1</sup>, Valentini A.<sup>1</sup>, Marsella A.<sup>2</sup>, Ghittino C.<sup>1</sup>, Agnetti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Terni; <sup>2</sup>DVM, Perugia

*Yersinia ruckeri*, batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è l'agente causale della Bocca Rossa o Yersiniosi (ERM). Colpisce per lo più i salmonidi ma è stata isolata anche in altre specie di pesci ed in altri animali (Danley *et al.*, 1999). Negli allevamenti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) può provocare elevate perdite economiche (Furones *et al.*, 1993). A livello laboratoristico, i test della motilità e dell'attività della fosfolipasi vengono usati per distinguere due biotipi di *Y. ruckeri*: il biotipo 1, mobile e con attività fosfolipasica ed il biotipo 2, che non possiede queste caratteristiche. In acquacoltura, l'utilizzo di agenti antimicrobici ha portato allo sviluppo di resistenze tra i batteri (Angulo, 2000; Rigos & Troisi, 2005; Huang *et al.*, 2014); in Italia, la ancora limitata disponibilità di sostanze terapeutiche registrate ha determinato una situazione di invecchiamento del gruppo di prodotti disponibili, con conseguente difficoltà nel contrastare l'insorgenza di eventuali fenomeni di antibioticoresistenza (Pennelli *et al.*, 2008). Scopo di questo studio è stato quello di analizzare le resistenze agli agenti antimicrobici più comunemente utilizzati nel trattamento della Bocca Rossa e di valutare se queste resistenze fossero correlate o meno alla mobilità del ceppo di *Y. ruckeri*. Sono stati studiati 25 ceppi isolati nell'ultimo decennio e provenienti da allevamenti ubicati in diverse zone del territorio nazionale. Per ogni isolato l'identificazione è stata ottenuta mediante le classiche prove laboratoristiche, come colorazione di Gram, test dell'ossidasi, test biochimici in micrometodo (API20E) e test di agglutinazione al lattice. La mobilità è stata valutata mediante semina su agar semisolido per mobilità. Una volta identificati, i ceppi di *Y. ruckeri* sono stati sottoposti a test per la suscettibilità agli antibiotici, applicando la tecnica della diffusione in Mueller-Hinton agar (metodo Kirby-Bauer). Ciascun ceppo è stato testato con un pannello di 7 antimicrobici: flumechina, ossitetraciclina, sulfatrimethoprim, florfenicolo, tiamfenicolo, amoxicillina, eritromicina. I dati ottenuti sono stati rielaborati statisticamente attraverso l'utilizzo del test esatto di Fisher. All'analisi dei risultati, è emersa un'assenza di resistenza nei confronti di ossitetraciclina, sulfatrimethoprim e florfenicolo, sia nei ceppi mobili che in quelli immobili di *Y. ruckeri*. Si sono invece riscontrate resistenze nei confronti di eritromicina (83% di resistenza nei ceppi immobili e 86% di resistenza nei ceppi mobili) ed amoxicillina (100% di resistenza nei ceppi immobili e 100% di resistenza nei ceppi mobili). Questi dati esprimono un comportamento sovrapponibile tra ceppi mobili e immobili di *Y. ruckeri*. Differenze sono invece state riscontrate nel caso di flumechina e tiamfenicolo. Per la flumechina è stata osservata un'assenza di resistenza nei ceppi mobili, contrapposta ad una resistenza del 45% nei ceppi immobili. Nei confronti di tiamfenicolo, i ceppi mobili hanno mostrato una resistenza del 71%, a differenza dei ceppi immobili dove la resistenza è stata riscontrata nel 94% dei casi. Sia per flumechina che tiamfenicolo tali differenze non risultano però statisticamente significative (rispettivamente p value=0.0573 e p value=0.1796).

Nello studio è stato constatato come la popolazione italiana di *Y. ruckeri* sia attualmente piuttosto eterogenea, con una maggior rappresentanza di ceppi immobili (n.18/25), in accordo con quanto riportato da Calvez *et al.* che riportano una netta dominanza del biotipo 1 (ceppo mobile) solo fino al 2007.

## **ESPRESSIONE DEL BIOFILM E DELLA PROTEINA A IN CEPPI DI *AEROMONAS HYDROPHILA* E *AEROMONAS BESTIARUM* ISOLATI IN CORSO DI PATOLOGIA IN SPECIE DULCIACQUICOLE**

Cocchi M.<sup>\*</sup>, Deotto S., De Zan G., Dalla Pozza M., Ustulin M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

Al genere *Aeromonas* appartengono bacilli Gram negativi, ossidasi positivi, agenti di patologia in diverse specie ittiche. La patogenesi dell'infezione da *Aeromonas spp* è legata all'effetto combinato di diversi fattori di virulenza: fra di essi si annoverano tossine, strutture di superficie (ad esempio la proteina A) e la capacità di formare il biofilm. Esso è costituito da una matrice di natura polimerica sintetizzata dai microrganismi stessi che determina una maggiore capacità di elusione delle difese dell'ospite, oltre ad essere implicata nei meccanismi di cronicizzazione dell'infezione e nell'aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici e ai disinfettanti.

Nei ceppi di *Aeromonas spp.*, diversi studi hanno evidenziato come la formazione del biofilm sia specie-specifica e dipendente anche dall'origine del campione (ambientale *vs* clinico).

Obiettivo del presente lavoro è stato valutare l'espressione del biofilm in 23 ceppi di *Aeromonas spp* (6 ceppi di *A. hydrophila* e in 17 ceppi di *A. bestiarum*), precedentemente identificati con metodo biomolecolare. I ceppi sono stati isolati da diversi organi (cute, rene e milza) da pesci di acqua dolce, in corso di patologia. Il controllo positivo era rappresentato dal ceppo ATCC 7966 di *A. hydrophila*. La formazione del biofilm è stata studiata *in vitro* applicando il protocollo descritto da Dosler *et al* (2014) con il metodo Microtiter Plate Test (MPT), a 22±2°C in aerobiosi, utilizzando due terreni (Luria Bertani broth, LB, e Tryptone Soya broth addizionato all'1% di glucosio, TSB+GLU), come descritto in letteratura. L'interpretazione è stata eseguita secondo Stephanovic *et al.* (2004). La presenza della proteina A è stata determinata secondo quanto descritto da Bernoth (1990).

I ceppi di *A. bestiarum* si presentavano come forti produttori su entrambi i terreni (17/17 con LB e 16/17 con TSB+GLU). Per i ceppi di *A. hydrophila*, invece, 5/6 erano forti o moderati produttori quando testati con LB mentre solo 2/6 si mostravano forti produttori se testati con TSB+GLU. Nessun ceppo era produttore di proteina A.

Nello studio condotto, i ceppi di *A. bestiarum* si sono mostrati forti produttori di biofilm e i ceppi di *A. hydrophila* hanno espresso il biofilm preferenzialmente nel terreno meno ricco di nutrienti, come descritto in letteratura. La proteina A, struttura di superficie, non è stata espressa dai ceppi mesofili testati nel presente studio, diversamente da quanto riportato in letteratura. Sebbene associata ad esempio a proprietà adesive e di colonizzazione della mucosa intestinale, non sempre è associata a caratteristiche di virulenza.

La formazione del biofilm è un meccanismo complesso che vede implicati fattori legati al ceppo, all'ambiente e all'ospite. Secondo alcuni autori, i fattori coinvolti nel processo di adesione appaiono inoltre specie specifici. Considerando i diversi fattori e le specie del genere *Aeromonas* potenzialmente coinvolte in episodi patologici, approfondimenti sono necessari per meglio comprendere il ruolo delle strutture di superficie come la proteina A nei diversi isolati, nella formazione del biofilm. La valutazione dell'espressione del biofilm e la comprensione delle strutture coinvolte nel processo di adesione a superfici biotiche o abiotiche (primo step nella formazione del biofilm) può costituire un aiuto nel controllo/eradicazione del patogeno, ad esempio tramite l'allestimento di vaccini contro il biofilm.

## INFESTAZIONE DA NEMATODI IN ESEMPLARI DI CORMORANO COMUNE (*PHALACROCORAX CARBO*) DEL CENTRO E NORD ITALIA

Agnetti F.<sup>1</sup>, Sgariglia E.<sup>1\*</sup>, Scaglione F.E.<sup>2</sup>, Epifanio E.<sup>1</sup>, Ghittino C.<sup>1</sup>, Marsella A.<sup>3</sup>, Valentini A.<sup>1</sup>, Caffara M.<sup>4</sup>, Gustinelli A.<sup>4</sup>, Fioravanti M.L.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Perugia; <sup>2</sup> Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Veterinarie; <sup>3</sup> DVM, Perugia; <sup>4</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna

Negli ultimi anni è stata segnalata la presenza di stadi larvali di nematodi appartenenti al genere *Eustrongylides* (Nematoda, Dioctophymatidae) in specie ittiche del Lago Trasimeno (Dezfuli, 2015; Agnetti et al., 2016; Branciarri et al., 2016). Il ciclo biologico di questi parassiti sembra prevedere come primi ospiti intermedi anellidi oligocheti, riconoscendo come secondo ospite intermedio numerose specie ittiche e come ospite definitivo gli uccelli ittiofagi. In particolare, il cormorano comune (*Phalacrocorax carbo*) è descritto come uno degli ospiti definitivi di *Eustrongylides* spp., che, localizzandosi nella parete del proventricolo, causa la cosiddetta “Big Red Worm Disease”, responsabile di grave mortalità soprattutto in nidiacei (Spalding et al., 2008). In Europa, *P. carbo* è una specie tipica delle regioni settentrionali, mentre nell’area mediterranea è presente perlopiù come uccello svernante, sia in acque costiere che in bacini interni. La sua dieta è costituita da almeno 77 specie ittiche (Carss et al., 2003), fra cui *Perca fluviatilis*, *Micropterus salmoides* e *Atherina boyeri*, nelle quali è stata recentemente dimostrata la presenza di *Eustrongylides* sp. in Italia.

Scopo dell’indagine è stato quello di definire il grado di infestazione da parassiti di origine ittica in proventricoli di cormorani comuni di due diverse aree, quella del lago Trasimeno (Umbria) e quella comprendente allevamenti ittici e fiumi della provincia di Cuneo (Piemonte), valutando in particolare l’eventuale presenza del nematode *Eustrongylides* sp. e/o di altri elminti potenzialmente zoonotici. Ventisette soggetti (3 dell’area umbra e 24 dell’area piemontese), morti per cause di natura diversa, sono stati sottoposti ad esame necroscopico, con particolare riferimento al proventricolo; i nematodi isolati sono stati puliti in soluzione fisiologica, contati e conservati in etanolo al 70% per la successiva identificazione morfologica e molecolare. Sia negli esemplari umbri che in quelli piemontesi parassitati il grado di infestazione riscontrato è stato sovrapponibile, con una media di 9 elminti per stomaco esaminato. Dei 24 campioni piemontesi, 7 hanno mostrato presenza di nematodi nel proventricolo, identificati come *Contracaecum rudolphii*, parassita già descritto in Italia. Dei 2 soggetti umbri, solo uno ha mostrato presenza di nematodi nel proventricolo, identificati come *Eustrongylides* sp. I dati preliminari ottenuti avvalorano la presenza di *Eustrongylides* sp. nel Trasimeno, suggerendo che tale lago rappresenti un habitat ideale per il completamento del ciclo biologico di questo elminto. Ulteriori indagini verranno condotte aumentando la numerosità campionaria dei potenziali ospiti ed i siti di campionamento al fine di chiarire l’epidemiologia e la biologia di *Eustrongylides* sp. sul territorio nazionale.

Ricerca effettuata mediante il finanziamento del Ministero della Salute, nell’ambito della Ricerca Corrente 03/2015 (IZSUM 03/15 RC) - La bibliografia è disponibile presso gli autori.

# MOLECULAR IDENTIFICATION OF *AMYLOODINIUM OCELLATUM* INFECTION IN EUROPEAN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX*) AND EXPRESSION OF IMMUNE-RELATED GENES DURING NATURAL INFECTION

Byadgi O., Massimo M., Bulfon C., Beraldo P., Galeotti M., Volpatti D.

Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A). University of Udine, 33100 Udine, Italy.

Accumulated evidences indicated that in the Mediterranean area, amyloodiniosis represents a major hindrance for semi-intensive marine aquaculture causing extremely high mortalities in lagoon-type based rearing sites. *Amyloodinium ocellatum* (AO) is the most common and important dinoflagellate parasitizing fish, and is one of the few fish parasites that can infest several fish, that live within its ecological range. In the present study, *A. ocellatum* was collected from naturally infected European sea bass (*D. labrax*) during an outbreak in July 2016 from Pila (RO), Italy. Further, parasite samples were collected from European sea bass experimentally infected in laboratory by using a strain of *A. ocellatum* from Pila, Italy. Genomic DNA was isolated from infected gills and molecular analysis was performed using specific primers of *A. ocellatum* AO18SF and AO18SR. They amplified consistently and yielded 248 bp specific amplicon of *A. ocellatum*, that was also confirmed using sequencing and NCBI Blast analysis. The sequence was edited and submitted to NCBI GenBank with the accession number KY474336.1. The evolution tree was developed by neighbor joining phylogenetic analysis and indicated that the tree detected two groups of *A. ocellatum*. One group contains *A. ocellatum* from all the oceanic isolates, while the other contains isolate from the laboratory experimental infection. *A. ocellatum* from natural infected sample clustered well with their high bootstrap value counterparts from other isolates which are closely related to Mediterranean sea isolates. Further, multiple sequence alignment was performed using the CLUSTALW and indicated that sequenced AO was conserved with all the Mediterranean isolates. The results seem to be encouraging and on the other hand, the immune response of European sea bass to the parasite is still poorly understood. Therefore, further research will be conducted to determine the European sea bass immune related gene response (innate immunity, adaptive immunity, and stress) post *A. ocellatum* infection, using RNA-seq to generate transcriptomic data for gills and spleen, will be discussed. Altogether, the results on parasite identification and host immune-related genes will allow for a better understanding of immunity in European sea bass against *A. ocellatum*, carrying out detailed functional analysis of these genes and developing strategies aimed at an efficient immune protection against this infection.

**Keywords:** *Amyloodinium ocellatum*, European sea bass, immune related genes, RNA-seq

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*



## EFFETTI *IN VITRO* DI 16 COMPOSTI DI ORIGINE VEGETALE SULLA MOTILITÀ DI DINOSPORE DI *AMYLOODINIUM OCELLATUM*

Massimo M.<sup>\*</sup>, Beraldo P., Bulfon C., Volpatti D., Byadgi O., Galeotti M.

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A), Università degli Studi di Udine, Udine (UD)

L'amyloodiniosi, ovvero l'infezione sostenuta dal protozoo ectoparassita *Amyloodinium ocellatum*, è un serio problema per l'acquacoltura semi-intensiva nel bacino Mediterraneo, specialmente nei mesi più caldi quando si possono registrare tassi di mortalità anche del 100%. Nonostante questa infezione sia responsabile di ingenti perdite produttive, al momento non esistono presidi terapeutici che al contempo siano efficaci e autorizzati dalla legislazione nazionale e europea. Il solfato di rame (composto di prima scelta) e la formaldeide sono utilizzati per il controllo dell'infezione, in quanto efficaci sulle dinospore (stadio infettante), tuttavia essi non sono attualmente registrati in Italia per l'uso farmacologico.

Allo scopo di ridurre l'impatto che queste sostanze possono avere sull'ambiente e sulla salute animale, nell'ambito del progetto Horizon2020 ParaFishControl sono previste indagini mirate alla ricerca di terapie eco-sostenibili e attente al benessere animale. In quest'ottica, il nostro gruppo di ricerca sta valutando l'effetto *in vitro* di un pannello di 16 composti di origine vegetale sulla motilità di dinospore di *A. ocellatum*.

Le dinospore, originatesi in laboratorio da tomonti prelevati da un episodio spontaneo di malattia, sono state contate con camera conta cellule (S50 Sedgewick Rafter Cell, Pyser – SGI), quindi portate alla concentrazione approssimativa di 5200 dinospore/ml in terreno di coltura HBSS/IO<sub>2</sub> (1:1). Successivamente, esse sono state seminate in micropiastra da 96 pozzetti (100 µl/pozzetto) in cui precedentemente erano state allestite diluizioni seriali delle 16 sostanze oggetto di studio: 2<sup>1</sup>,4<sup>1</sup> – diidrossicalcone; 7 – idrossiflavone; acido rosmarinico; artemisinina; canfora (1R); diallil solfuro; esculetina; eucaliptolo; garlicina 80%; harmalolo idrocloruro diidrato; palmartina cloruro; piperina; resveratrolo; sclareolide; tomatina e umbelliferone. Ciascuna concentrazione di composto (6,25 µg/ml – 50 µg/ml, 100 µl/pozzetto) è stata saggiata in duplicato. Come controllo inibente positivo è stato utilizzato il solfato di rame (0,25 – 1 µg/ml), mentre il controllo negativo consisteva in dinospore incubate in solo terreno di coltura. Mediante camera per sedimenti urinari (Vacutest Kima precision cell) sono state osservate al microscopio ottico aliquote (50 µl/pozzetto) prelevate dalla piastra dopo 1, 6 e 24 ore di incubazione a temperatura ambiente, al fine di contare le dinospore non motili. Quindi è stata calcolata la percentuale di dinospore ancora natanti per ciascuna concentrazione di composto e ai diversi tempi di incubazione.

Fra le sostanze saggiate, la tomatina e il 2<sup>1</sup>,4<sup>1</sup> – diidrossicalcone hanno ridotto notevolmente e con effetto dose-dipendente il moto delle dinospore. Per questo motivo i due composti sono stati ulteriormente saggiati in un *range* più ampio di concentrazioni (0,39 – 50 µg/ml). La tomatina è risultata in grado di arrestare la motilità del 100% sin dalla prima ora di incubazione fino alla concentrazione di 6,25 µg/ml. Invece, alle concentrazioni minori (0,39 – 3,13 µg/ml) più dell'80% dei protozoi era attivo anche dopo 24 ore di incubazione. Il flavonoide 2<sup>1</sup>,4<sup>1</sup> – diidrossicalcone si è rivelato inibitore solo alle concentrazioni più elevate (50 e 25 µg/ml) nella prima ora d'incubazione, mentre la sua efficacia è risultata limitata a concentrazioni ≤ 12,5 µg/ml e in generale dopo 6 ore di incubazione. Le altre sostanze non hanno avuto alcun effetto rilevante sulla motilità dei protozoi, mentre il solfato di rame si è dimostrato efficace alla concentrazione di 1 µg/ml nelle prime ore di incubazione.

Ulteriori studi *in vitro* sono necessari per approfondire le conoscenze sull'attività di queste molecole e per selezionare *in vivo* dosi di tomatina e 2<sup>1</sup>,4<sup>1</sup> – diidrossicalcone non tossiche per i pesci.

## **GRAVE EPISODIO DI AMYLOODINIOSI IN GIOVANILI DI BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*): ANALISI DEI DETERMINANTI DI MALATTIA E RILIEVI ANATOMOPATOLOGICI**

Beraldo P., Byadgi O., Massimo M., Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M.

*Sezione di Scienze Animali e Veterinarie, Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Università di Udine.*

*Amyloodinium ocellatum* (AO) è un dinoflagellato parassita obbligato di pesci d'acqua salata e salmastra, ha una distribuzione cosmopolita, una bassa specificità per l'ospite (parassita più di un centinaio di specie di teleostei) e un ampio *range* ecologico, colonizzando molteplici ambienti acquatici.

Questo protozoo, in alcune situazioni di allevamento, rappresenta un serio problema, poiché, se il controllo della malattia non è tempestivo, la mortalità può raggiungere il 100%. Per l'allevamento confinato in acquario di molte specie ittiche ornamentali e soprattutto per l'acquacoltura semi-intensiva di branzino e orata in Italia, e anche in alcuni Paesi Europei (Spagna e Portogallo), questo parassita rappresenta un fattore limitante, piuttosto temuto, della produzione. La sua patogenicità, tuttavia, è notevolmente influenzata da fattori ambientali quali salinità e temperatura dell'acqua (determinanti esogeni) e la probabilità di malattia aumenta sinergicamente con alcuni fattori endogeni dell'ospite (stato di salute, condizione immunitaria e età). Con questo incipit gli autori ritengono interessante descrivere un grave episodio di amyloodiniosi, intercorso nel luglio scorso, in un allevamento di branzino situato nel territorio dell'area deltizia del fiume Po. Ovviamente, com'è noto, in tale area il parassita è presente, ma la sua presenza non è di per sé foriera di episodi così rovinosi, come in questo caso, in cui la mortalità di giovanili di branzino è stata del 100% in meno di una settimana. Nel suddetto episodio di amyloodiniosi, i fattori ambientali salienti sono stati il tipo di approvvigionamento idrico dell'allevamento (lago salmastro, acqua a 7‰ di salinità), temporali intensi con forti venti e temperature stagionali molto elevate. Le conseguenze di queste avverse condizioni meteo sono state un brusco calo dell'ossigeno dell'acqua e l'arrivo del parassita in allevamento, che in associazione alla taglia del pesce (40-50g), allo stato di immunodepressione e stress, conseguenti a ipossia acuta, hanno provocato questa grave e letale forma di amyloodiniosi. Dal punto di vista anatomopatologico il dato più interessante, a conferma di quanto già osservato in altri episodi di malattia in branzino, è la quasi totale assenza di trofonti a livello cutaneo (anche in presenza di elevatissimo carico parassitario), che invece colonizzano completamente il cavo orofaringeo. Tale condizione è meglio illustrata dall'esame istologico di branchie e sezioni longitudinali della testa, nelle quali si evince chiaramente il potenziale distruttivo del parassita (ulteriori dettagli istopatologici saranno oggetto della trattazione).

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*

## INDAGINE ISTOPATOLOGICA, PARASSITOLOGICA E MOLECOLARE DI FORME LARVALI DI CESTODI IN *GALEUS MELASTOMUS*

Saitta M.<sup>1\*</sup>, Gaglio G.<sup>2</sup>, Manghisi A.<sup>1</sup>, Caputo S.<sup>2</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali Università di Messina, Messina;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie Università di Messina, Messina.

Volgarmente conosciuto come gattuccio boccanera, *Galeus melastomus* è un piccolo elasmobranco distribuito nella zona est dell'Oceano Atlantico, dalla Norvegia al Senegal, e in tutto il Mediterraneo. Poco si conosce sulla sua biologia e distribuzione, soprattutto nella fascia costiera analizzata. La sua abbondanza, in termini sia di numeri che di biomassa, lo rende particolarmente interessante dal punto di vista dell'ecosistema marino. Da aprile 2016 ad aprile 2017 sono stati raccolti 100 esemplari di *G. melastomus*; le forme larvali rinvenute sono state analizzate da un punto di vista parassitologico, istopatologico e molecolare. Gli esemplari sono stati catturati nella zona compresa tra Brolo e Ponte Naso (Messina) ad una profondità non superiore ai 500 m; presentavano una lunghezza media di 41 cm e un peso medio di 286.5g. Da tagli effettuati perpendicolarmente alla colonna per controllare la muscolatura è emersa un'infestazione massiva di larve di cestodi localizzate principalmente in posizione caudale. Tutti gli esemplari di *G. melastomus* analizzati sono risultati positivi alla presenza di plerocerci; alcuni di essi (n = 100) sono stati opportunamente misurati, con una media di 3,6 mm. L'esame istopatologico ha messo in evidenza la presenza di parassiti tra le fibre muscolari in assenza di un'evidente risposta tissutale. Dalle sezioni si evince soltanto un'esile capsula fibroblastica dovuta alla reazione dell'ospite costituita da uno o due strati di cellule e una modica infiltrazione interstiziale leucocitaria, perilarvale e perifibrile. È evidente un danno tissutale ai danni di *G. melastomus* rappresentato da una modica atrofia muscolare e/o del connettivo attorno ai parassiti, quale espressione di una lesione da compressione, prevedibile per una modificazione patologica spazio-occupante. Nel tratto gastroenterico sono state inoltre isolate altre forme larvali di cestodi con una frequenza del 70%. Per l'indagine molecolare è stato scelto di amplificare il gene LSU. Le analisi filogenetiche effettuate utilizzando le sequenze disponibili per la famiglia Lacistorhynchidae hanno consentito di effettuare l'identificazione dei plerocerci isolati dalla massa muscolare di *G. melastomus* come appartenenti al genere *Grillotia*. In particolare il campione è risultato associato ad una sequenza identificata come *Grillotia rowei* isolata da *Coryphaenoides armatus* catturato in Australia seppur con supporto statistico variabile (0,93; 68%; 59%). Quest'ultima associazione è da considerare un'ipotesi di lavoro da verificare. Le analisi filogenetiche effettuate utilizzando le sequenze disponibili per la famiglia Spyriocephalidae hanno consentito di effettuare l'identificazione dei campioni isolati dal gastroenterico come appartenenti alla specie *Sphyrycephalus viridis* con pieno supporto statistico in tutte le analisi. La parassitosi da *Grillotia* sp. in *G. melastomus* osservata in questo studio si presenta con un'abbondanza elevata: in un esemplare di poco meno di 500 g sono stati riscontrati oltre 850 parassiti. La media si aggirava intorno a 265 parassiti per individuo. Analisi statistiche calcolate tramite l'indice di correlazione lineare di Pearson hanno mostrato una correlazione lineare tra il peso e numero di parassiti solamente nei soggetti di sesso femminile, probabilmente per un diverso comportamento alimentare rispetto ai soggetti maschi. La presenza di *Grillotia* nei campioni esaminati è stata del 100%, confermando un elevato indice di coevoluzione tra ospite e parassita. Questa esperienza, sulla base della ricerca bibliografica, risulta essere il primo ritrovamento di forme larvali di cestodi nella muscolatura scheletrica di selacei nell'area Mediterranea.

## EFFICACIA *IN VITRO* DI MOLECOLE E PRODOTTI COMMERCIALI NEI CONFRONTI DI *SAPROLEGNIA* SPP.

Tedesco P.<sup>\*</sup>, Galuppi R., Ciardo M.L., Fioravanti M.L.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Le infezioni sostenute da oomiceti del genere *Saprolegnia* rappresentano un problema economicamente rilevante nell'allevamento dei salmonidi. La scarsa efficacia delle misure profilattiche attualmente disponibili e l'assenza di trattamenti registrati per il controllo della saprolegniosi non permettono di contenere significativamente le perdite in acquacoltura, rendendo di estremo interesse le ricerche focalizzate sull'individuazione di nuovi metodi di controllo. In letteratura si ritrovano numerosi studi con proposte per l'utilizzo di prodotti alternativi al verde malachite, in passato utilizzato ampiamente in acquacoltura sia su pesci che su uova per la sua elevata attività fungicida. In questo lavoro, dopo una breve review sui metodi tradizionalmente usati per il trattamento delle infezioni da *Saprolegnia* spp. in acquacoltura, vengono presentati i risultati di uno screening *in vitro* effettuato con l'obiettivo di valutare l'attività inibente e fungicida di otto sostanze pure (acido acetico, acido benzoico, acido lattico, acido ossalico, acido tartarico, perossido di idrogeno, percarbonato di sodio) e tre prodotti commerciali (Actidrox®, Detarox AP®, Virkon®), utilizzando il verde malachite come controllo. I prodotti sono stati testati su tre diversi ceppi di *Saprolegnia*: un ceppo standard (CBS 233.65) di *Saprolegnia parasitica* isolato in Olanda da *Esox lucius*, un ceppo di campo di *Saprolegnia parasitica* isolato in Italia da *Salmo trutta fario* ed uno di *Saprolegnia delica* isolato in Italia da *Oncorhynchus mykiss*. Ciascun ceppo è stato testato in triplicato.

Le metodiche utilizzate si sono basate sui protocolli I e II descritti da Alderman (1982) che prevedono rispettivamente un test di screening in agar, utile a valutare la minima concentrazione inibente (MIC), ed un test per contatto di un'ora in soluzione acquosa, utile a valutare la minima concentrazione letale (MLC) dei prodotti testati. Per ciascun prodotto sono state testate le seguenti concentrazioni: 0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 250; 500; 1000; 5000 mg o µl/L (a seconda si trattasse di prodotti liquidi o solidi).

L'acido benzoico ha mostrato la più bassa MIC (100 mg/L), mentre Virkon® non ha mostrato nessun effetto alle concentrazioni saggiate. Actidrox® e Detarox® hanno mostrato un comportamento differente nei due test, presentando una MLC inferiore alla MIC. Tale comportamento è probabilmente riconducibile alla modalità di azione dei prodotti, legata alla presenza di acido peracetico e che quindi probabilmente in presenza di acqua esprime meglio la sua efficacia nei confronti di *Saprolegnia*.

I risultati di questo screening preliminare dovranno essere approfonditi con ulteriori test *in vitro* sui composti più promettenti al fine di valutarne il possibile futuro utilizzo in acquacoltura.

Alderman D.J. (1982). In vitro testing of fisheries chemotherapeutants. *J. Fish Dis.*, 8: 289-298.

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*

## **MICROSPORIDIOSI DA *LOMA SALMONAE* (MICROSPORIDIA) IN TROTE IRIDEE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) D'ALLEVAMENTO**

Quaglio F.<sup>1</sup>, Perolo A.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Legnaro (PD); <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)

Le microsporidiosi ittiche rappresentano problematiche di rilievo sanitario e commerciale nel settore ittico e sono sostenute da parassiti endocellulari obbligati a trasmissione diretta. Alcuni generi di microsporidi si caratterizzano per la formazione di una struttura denominata xenoma, che rappresenta uno stato di iperbiosi della cellula parassitata abnormemente ipertrofica e spesso visibile anche macroscopicamente.

Con il presente lavoro si intende riportare l'attenzione sulla microsporidiosi da *Loma salmonae* (Microsporidia) nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), malattia che in Italia è probabilmente sottostimata per il suo decorso apparentemente sub-clinico. In una trota coltura intensiva del nord Italia nel corso del 2016-2017, durante alcuni campionamenti eseguiti a scopo diagnostico in corso di episodi di mortalità, sono stati osservati numerosi esemplari di trota iridea che all'esame anatomico-patologico mostravano anemia branchiale e, all'apertura della cavità corporea, un esteso emopericardio. All'esame microscopico a fresco delle branchie si evidenziavano formazioni cistiche a carico dei filamenti e delle lamelle che, ad elevato ingrandimento, presentavano ammassi di piccole spore riferibili a microsporidi.

Porzioni di branchie e di organi viscerali sono state quindi fissate in formalina tamponata al 10% e sottoposte ad esame istologico.

Il quadro istopatologico ha permesso di confermare nelle branchie la presenza diffusa di formazioni cistiche morfologicamente riferibili a xenomi e contenenti all'interno spore di microsporidi, presumibilmente riferibili alla specie *Loma salmonae*. Nei filamenti branchiali gli xenomi apparivano all'interno delle arteriole a carico dell'endotelio; a livello delle lamelle i capillari risultavano dilatati per la presenza degli xenomi, che presentavano una sottile parete.

Nel cuore si rilevavano, fra gli eritrociti presenti nella cavità atriale e ventricolare, spore libere aggregate o singole e talvolta circondate da una sostanza eosinofila fibrillare. Rare spore sono state riscontrate nell'epicardio del ventricolo in presenza di estesa reazione flogistica con infiltrazione linfocitaria e macrofagica. Si osservavano alcuni xenomi anche nel parenchima splenico circondati da linfociti e con presenza di cellule giganti multinucleate. Il rene non presentava lesioni di rilievo correlate alla presenza di rari microsporidi.

Dalle numerose descrizioni presenti in letteratura i parassiti reperiti nelle branchie e a livello cardio-circolatorio rappresenterebbero rispettivamente spore e stadi merogonici morfologicamente riferibili a *Loma salmonae*.

In base alle nostre conoscenze non risultano descritti attualmente in Italia casi di microsporidiosi da *L. salmonae* nelle trote, sebbene diversi colleghi ne testimonino la presenza in numerosi allevamenti sul territorio nazionale.

Alla luce dell'importanza di *L. salmonae* in salmonicoltura, in particolare nei salmoni del genere *Oncorhynchus*, quale causa primaria di mortalità e di marcato peggioramento degli indici produttivi, ulteriori indagini si rendono necessarie per chiarire il ruolo di questi microrganismi come agenti primari di malattia nella trota iridea oppure in grado di esacerbare/predisporre ad altre patologie.

## STUDIO RETROSPETTIVO SUL RUOLO DELLE TECNICHE DIAGNOSTICHE DI BASE IN ITTIONCOLOGIA

Iaria C.<sup>1</sup>, Lanteri G.<sup>2</sup>, Corti I.<sup>3</sup>, Mazzullo G.<sup>2</sup>, Marino F.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME);

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina (ME); <sup>3</sup>Consulente Veterinario, Milano (MI)

L'oncologia dei teleostei e lo studio della carcinogenesi si stanno dimostrando, oggi giorno, ambiti di ricerca sempre più oggetto di grande interesse da parte della comunità scientifica, al fine di comprendere lo sviluppo e la proliferazione incontrollata di diversi tipi cellulari. In questo studio si intende presentare una rassegna casistica di differenti tumori in teleostei, con diversa origine cellulare, comprendente diversi casi osservati negli ultimi quindici anni presso l'Unità di Patologia e il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (C.I.S.S.). Il fine ultimo è di evidenziare secondo il tipo cellulare i metodi diagnostici più efficaci e sottolineare l'importanza nell'utilizzo delle tecniche immunoistochimiche, laddove efficaci, così come dell'istochimica e dell'istologia di base.

Obiettivo del presente lavoro è presentare uno studio retrospettivo di casi pregressi di tumori nei pesci al fine di evidenziare le più efficaci tecniche diagnostiche; nello specifico sono state valutate le metodiche diagnostiche applicate per l'identificazione cellulare utilizzate su un totale di 44 casi: un papilloma in carassio dorato (*Carassius auratus*), un papilloma in abramide (*Abramis brama*), un carcinoma a cellule squamose in scazzone (*Cottus gobio*), un fibroma in mormora (*Lythognathus mormyrus*), un angioleiomioma in grongo (*Conger conger*), tre tumori di origine odontogenica in scalare (*Pterophyllum scalare*), un lipoma in tonno (*Thunnus thynnus*) e uno in velifera (*Poecilia velifera*), un lipoma infiltrante multicentrico in branzino (*Dicentrarchus labrax*), schwannomi in venti carassi dorati (*Carassius auratus*), un carassio comune (*Carassius carassius*), uno zebrafish (*Danio rerio*) e un'orata (*Sparus aurata*), un neurofibroma in cefalo (*Mugil cephalus*), otto casi di mixoma multicentrico delle guaine dei nervi periferici in anguilla (*Anguilla anguilla*), e un melanoma in un ibrido di *Xiphophorus* (*Xiphophorus helleri* X *Xiphophorus maculatus*). Gli anticorpi utilizzati nei diversi studi sono stati: S-100, vimentina e actina per fibroma; S-100 e melan-A per melanoma; S-100 e GFAP per mixoma; S-100, D2-40, CD20, CD34, CD68, pancitocheratina, CK5/6, CK8, CK18, EMA, actina muscolo liscio, desmina, mioglobina, GFAP, NSE, e Ki-67 per angioleiomioma; S-100 e pancitocheratina per papilloma; pancitocheratina e vimentina per carcinoma a cellule squamose; S-100, calretinina e vimentina per schwannoma e neurofibroma.

Le tecniche immunoistochimiche, sebbene con utilizzo di anticorpi non specie-specifici, risultano senza dubbio un metodo essenziale nel raggiungimento di una diagnosi univoca di quasi tutti i tipi cellulari; tuttavia non risultano utilizzabili laddove la massa tumorale è caratterizzata da una matrice quasi acellulare ovvero dove la caratterizzazione cellulare è possibile già o solo a livello istochimico su preparati criostatati. Inoltre, dove il tumore è caratterizzato da abbondanti prodotti cellulari, ma non da cellule neoplastiche, risulta impossibile discriminarli con queste metodiche. Diviene importante, quindi, non trascurare le tecniche istochimiche ed istologiche di base che talora possono aiutare nel raggiungimento di diagnosi certe. La validazione dell'immunoreazione comunque deve essere sempre effettuata mediante l'uso di controlli positivi e negativi.

## INDAGINE ISTOLOGICA, ULTRAISTRUTTURALE E MOLECOLARE IN CARCINOMI SQUAMOCELLULARI DI CARPE KOI

Volpe E.<sup>1</sup>, Sirri R.<sup>1</sup>, Barbè T.<sup>2</sup>, Errani F.<sup>1\*</sup>, Lazzari M.<sup>3</sup>, Franceschini V.<sup>3</sup>, Sarli G.<sup>1</sup>, Mandrioli L.<sup>1</sup>, Ciulli S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO);

<sup>2</sup> DAP Tim Barbè, Lennik, Belgium; <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna (BO)

I carcinomi squamocellulari cutanei (CSC) sono costituiti da masse solide, bianche, a margini irregolari che tendono ad ulcerarsi ed infiammarsi. I CSC sono stati descritti in varie specie ittiche fra le quali la carpa comune e la sua varietà koi (*Cyprinus carpio*). Istologicamente possono avere diffusione locale oppure, nelle forme più invasive, oltrepassare la membrana basale formando trabecole o nidi nello spessore del derma; inoltre, essi sono caratterizzati da nidi di cellule epiteliali metaplastiche dette "perle cornee", numerose figure mitotiche e fenomeni di anisocitosi e anisocariosi. Varie ipotesi sono state fatte sulle cause che inducono la comparsa di CSC, quali la presenza di contaminanti ambientali, sostanze radioattive, fioriture algali, parassiti e virus. Inoltre, è riportata l'occasionale trasformazione maligna in CSC di papillomi indotti da infezione da *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1). Il CyHV-1, infatti, è un virus oncogeno associato allo sviluppo di lesioni papillomatose cutanee nella carpa, anche definite come "carp pox" o epithelioma papillosum. Ad oggi, le indagini eziologiche svolte su CSC della carpa non hanno permesso di evidenziare particelle virali nel tessuto tumorale. Il presente studio è stato svolto con lo scopo di investigare le caratteristiche istologiche e ultrastrutturali di neoplasie squamocellulari cutanee di carpe koi in campioni di archivio. Inoltre, al fine di investigare l'eventuale presenza di *Cyprinivirus* (CyHV) nel tessuto tumorale ed il loro possibile ruolo patogenico, è stata condotta una indagine molecolare per la ricerca di DNA ed mRNA riconducibile ai CyHV. Nello studio sono stati esaminati quattordici campioni chirurgici di carcinomi squamocellulari cutanei di carpe koi mantenute in laghetti privati in Belgio. I campioni fissati in formalina sono stati sottoposti ad analisi istologica di routine. Una selezione di casi è stata inoltre sottoposta ad indagine ultrastrutturale (n = 3) e molecolare (n = 5). Per l'indagine molecolare i campioni inclusi in paraffina sono stati sottoposti a trattamento con xylene, quindi ad estrazione di DNA e mRNA totale. La conservazione del DNA e del mRNA dei campioni analizzati è stata valutata tramite l'amplificazione di geni housekeeping (TSH ed EF- $\alpha$ ). I campioni sono stati quindi sottoposti alla ricerca del DNA e mRNA virale riferibile a quello dei CyHV tramite l'applicazione di una metodica di amplificazione genica precedentemente pubblicata in grado di rilevare tutti i *Cyprinivirus*. L'analisi istologica ha evidenziato un tessuto neoplastico non demarcato, infiltrante il derma a formare nidi e cordoni. Le cellule neoplastiche mostrano discheratosi, citoplasma intensamente eosinofilo e formano sparsi centri di cheratinizzazione metaplastica (perle cornee). All'osservazione ultrastrutturale in microscopia elettronica (TEM) le cellule neoplastiche dei CSC presentano nuclei ovali o arrotondati con cromatina finemente dispersa, piccoli aggregati periferici e uno o due nucleoli; a conferma dell'origine epiteliale sono stati riscontrati numerosi desmosomi. Tuttavia non è stato possibile evidenziare la presenza di particelle virali nelle cellule esaminate. L'indagine molecolare ha permesso di identificare nei 5 campioni esaminati la presenza del DNA di *Cyprinivirus*. Il sequenziamento del frammento di DNA amplificato da 3 campioni ha permesso di identificare la presenza di *Cyprinid herpesvirus 1*. La ricerca dei trascrittomi virali nel mRNA ha invece dato esito negativo, facendo ipotizzare che il CyHV-1 si trovasse in stato di latenza. Questa ricerca ha quindi evidenziato una frequente associazione del CyHV-1 con i CSC. Ulteriori studi potranno chiarire se tale virus ha avuto un effetto carcinogenico diretto o se si tratta di papillomi progrediti a carcinomi a causa di ulteriori fattori oncogeni quali l'esposizione alle radiazioni solari.

## ISTOLOGIA APPLICATA ALLA PATOLOGIA ITTICA: L'ESPERIENZA IZSUM

Valentini A.<sup>1</sup>, Sgariglia E.<sup>1\*</sup>, Epifanio E.<sup>1</sup>, Marsella A.<sup>2</sup>, Ghittino C.<sup>1</sup>, Manuali E.<sup>1</sup>, Agnetti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Terni & Perugia; <sup>2</sup> DVM, Perugia

Oggi molte tecniche assodate nell'istologia dei mammiferi terrestri sono disponibili anche nel settore dell'ittipatologia. Particolare attenzione deve comunque essere rivolta alla preparazione del campione, in quanto il rapido tasso di autolisi dei tessuti del pesce rispetto a quelli degli organismi omeotermi può determinare alterazioni degenerative, rendendo la diagnosi inaffidabile o impossibile (Roberts, 2012). I pattern istopatologici possono indicare diversi disturbi ed anomalie che influenzano i tessuti fisiologici recando danni cellulari ed alterazioni fisiopatologiche, alcune delle quali anche patognomoniche (Ahmadmoradi *et al.*, 2012). La presente indagine rappresenta una valutazione retrospettiva degli esami istologici su matrici ittiche eseguiti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche (IZSUM) nel corso del decennio 2008-2017, al fine di interpretare il trend istopatologico in esemplari di pesci campionati nel territorio di competenza. Si è proceduto all'estrazione dei dati riguardanti tutti gli esami istologici eseguiti sui pesci, distinti per singolo anno. Nei casi in cui un campione fosse stato accettato come pool, il dato è stato considerato come singolo esemplare. I dati estratti sono stati rielaborati statisticamente mediante test esatto di Fisher. Nel periodo di tempo preso in considerazione sono stati eseguiti un totale di n. 233 esami istologici. Diversi sono stati gli organi processati e quelli più frequentemente esaminati sono risultati branchie (n. 67), fegato e cervello (entrambi n. 27). A seguire intestino (n. 17), milza (n. 16), rene (n.14), annessi cutanei (n.9), occhio (n. 7), muscolo (n. 6) e gonadi (n. 4). Dai risultati ottenuti, è emerso come 33 campioni non siano risultati diagnosticamente idonei in quanto autolitici. Dei 200 campioni restanti, solo nel 15% dei casi (n. 30) l'esame istologico ha fornito una diagnosi di certezza. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra branchie, fegato e cervello nel fornire una diagnosi di certezza (p-value=0.0848). Alcuni autori definiscono l'istologia un buon indicatore di stress ambientale e di esposizione agli agenti chimici e contaminanti (Matthiessen *et al.*, 1993; Stentiford *et al.*, 2003) e un importante arma per la diagnosi di molte patologie dei pesci (Ahmadmoradi *et al.*, 2012). In base alla nostra esperienza, in alcune patologie e in determinati organi l'esame istologico ha consentito il raggiungimento di una diagnosi eziologica, come nel caso delle lesioni da Nodavirus (Péducasse *et al.*, 1999), delle parassitosi (es. Costiasi) o delle Micobatteriosi. Per queste ragioni, in accordo con altri autori (Ahmadmoradi *et al.*, 2012), l'istologia può essere considerata uno strumento valido per la diagnosi di alcune importanti malattie dei pesci.



## VALUTAZIONE DI NUOVE TECNICHE DI STORDIMENTO (*STUNNING*) DELLA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) PER RIDURRE LO STRESS IN FASE DI MACELLAZIONE

Manfrin A.<sup>1\*</sup>, Fiocchi E.<sup>1</sup>, Del Tedesco F.<sup>2</sup>, Bertotto D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro di Referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei - CSI Adria (RO); <sup>2</sup> Azienda Agroittica Friulana - Porcia (PN); <sup>3</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione - Università di Padova - Agripolis - Viale dell'Università 16 - Legnaro (PD)

Diversi studi hanno dimostrato come i pesci, tra cui la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), presentino dei nocicettori e siano in grado di provare dolore, paura e stress, soprattutto durante le manipolazioni, il trasporto, nei periodi di digiuno, nelle fasi di vaccinazione e durante la macellazione. Nelle fasi di abbattimento, i pesci cercano di resistere allo stress adottando delle strategie comportamentali e fisiologiche di adattamento e i metodi di macellazione devono tenere in considerazione il fatto che gli animali vanno abbattuti rapidamente, causando la minor sofferenza possibile. Per questi motivi c'è sempre più interesse a sviluppare tecniche che consentano un'immediata perdita di coscienza degli animali, in modo da permettere una macellazione più umana anche nell'allevamento di questi animali. Scopo della presente ricerca è stato quello di testare una nuova tecnica di stordimento (*stunning*) nella trota iridea in grado di dare un'elevata e rapida perdita di coscienza e di sensibilità degli animali, al fine di evitare sofferenze inutili e allo stesso tempo ridurre il deterioramento della carcassa durante la macellazione. L'immersione rapida degli animali in una soluzione acquosa al 5 % di NaCl a basse temperature (-4/-8°C) è stata confrontata con una tecnica classica di stordimento (annocatura) in soggetti di circa 300 g in diverse condizioni climatiche (temperatura dell'acqua da 7° a 14°C). Le analisi effettuate confermano che sia l'annocatura che il metodo innovativo possono produrre limitato stress negli animali, se svolte con rapidità e professionalità. Cortisolo, catecolamine e lattato si sono confermati ottimi indicatori di risposta allo stress; inoltre il cortisolo, misurato in matrici diverse dal sangue, è risultato fortemente correlato con quello plasmatico e può essere utilizzato *in vivo*, mediante prelievo di matrici limitatamente invasive come muco e pinna, e al termine della macellazione (prelievi *post mortem*). La malondialdeide, testata nel plasma e nel muscolo come indice di perossidazione lipidica, non è invece risultata efficiente nel valutare differenze legate al metodo di stordimento. I suoi livelli sono stati influenzati dal campionamento, quindi dalle procedure pre-stordimento/macellazione e, considerando che si tratta, oltre che di un indicatore di stress ossidativo, anche di un indice di qualità della carne, questo conferma la necessità di mettere in atto delle buone prassi per ridurre lo stress degli animali nelle fasi di pre-macellazione, per garantire sia il benessere degli animali che la qualità del prodotto finale. Il metodo innovativo, ovvero l'immersione in soluzione salina a -4/-8°C degli animali, è risultato, al pari dell'altro metodo testato, efficace nel produrre il rapido stordimento delle trote, indipendentemente dalla loro taglia e dallo sbalzo termico al quale gli animali erano stati sottoposti. L'immersione ad una temperatura sotto il punto di congelamento non ha prodotto però effetti sul filetto in termini di deterioramento delle fibre, mentre sembra determinare effetti favorevoli sulla shelf-life, con una riduzione sia degli psicrofili che di *Pseudomonas* spp., che sono agenti primari nei processi di deterioramento delle carni nelle specie ittiche allevate in acque fredde/temperate.

## **SVILUPPO DI METODI MOLECOLARI ED ISTOLOGICI PER LA RILEVAZIONE DI BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO IN BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E ORATA (*SPARUS AURATA*)**

Fiocchi E.<sup>1</sup>, Civettini M.<sup>1</sup>, Pretto T.<sup>1</sup>, Basaglia M.<sup>2</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro di Referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei – CSI Via L. Da Vinci 39, 45011 Adria (RO); <sup>2</sup> Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD).

Nel corso degli anni, l'attenzione e lo studio del benessere animale ha assunto un significato sempre più importante, non solo per motivi etici, ma anche perché rappresentativo della qualità dell'ambiente e, più in generale, delle condizioni di vita in cui gli animali sono mantenuti.

Le specie ittiche, come gli altri animali, sono in grado di provare stress causati da cattive condizioni di allevamento. Con l'incremento esponenziale dell'acquacoltura mondiale, sempre più spesso vengono richieste e finanziate ricerche con l'obiettivo comune di dimostrare la sensibilità degli animali acquatici in ambienti confinati come l'allevamento, dove possono subire variazioni di densità, ossigeno, salinità, temperatura, venire a contatto con agenti infettivi e/o chimici.

Tramite il progetto WIN-FISH si è voluto sviluppare, diverse metodiche, una basata sulla Real-Time PCR ed una immunoistochimica per la ricerca, la localizzazione e la quantificazione di biomarcatori di stress ossidativo in branzino (*Dicentrarchus labrax*) e in orata (*Sparus aurata*).

In particolare, sono state allestite prove di stress da manipolazione e da innalzamento della temperatura per verificare, tramite metodo molecolare, l'andamento dell'espressione genica della Heat Shock Protein 70 in branzini stressati, paragonandolo a quello dei gruppi di controllo; con la tecnica immunoistochimica si è invece voluto localizzare e studiare la presenza di nitrotirosina, HSP70, malondialdeide e 4-idrossinonenale nei diversi organi campionati provenienti da soggetti sottoposti a stress. È stata valutata anche la presenza delle Rodlet Cell tramite tecnica istologica sia nei gruppi di controllo che in quelli stressati.

Dai risultati ottenuti è stato possibile concludere che la metodica Real-Time PCR sviluppata si è rivelata specifica per il gene target ricercato e che la manipolazione è un forte fattore stressante per gli animali, così come anche un innalzamento della temperatura. Dai valori di quantificazione relativa è infatti possibile osservare un aumento dell'espressione genica di HSP70 rispetto al gruppo di controllo, dopo gli eventi stressanti testati.

Le analisi condotte sui singoli organi hanno permesso di dimostrare che l'andamento dell'espressione genica di HSP70 non è correlato alla tipologia di tessuto testato.

Col metodo istologico è stato possibile rilevare le Rodlet Cell negli animali stressati, avvalorando l'ipotesi che queste cellule facciano parte dell'immunità innata degli animali acquatici e che intervengano a seguito di eventi stressanti.

Gli anticorpi utilizzati per la colorazione immunoistochimica si sono dimostrati adeguati e specifici: è stato possibile inoltre apprezzare l'aumento di immunoprecipitati nei branzini manipolati o stressati dall'innalzamento della temperatura.

Il presente lavoro rappresenta un punto di partenza necessario per riuscire a quantificare HSP70 e identificare altri biomarcatori di stress rilevabili nelle specie ittiche allevate, in maniera tale da poter fornire indicazioni al settore dell'acquacoltura per migliorare le condizioni di benessere degli animali e di conseguenza incrementare la produttività.

## **MACROINVERTEBRATI BENTONICI E CONTAMINAZIONE DA ELEMENTI TRACCIA: UNA POSSIBILE MATRICE PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE DOLCI SUPERFICIALI?**

Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Squadrone S.<sup>1</sup>, Bertoli M.<sup>2</sup>, Abete M.C.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Pizzul E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

La contaminazione da elementi traccia è una problematica ambientale ampiamente diffusa nei corsi d'acqua. Il monitoraggio di tali contaminanti negli ecosistemi acquatici è basato molto spesso sulla loro determinazione nella colonna d'acqua, nel particolato in sospensione e/o nel sedimento. Tuttavia, queste misurazioni definiscono solo il momentaneo stato di inquinazione, senza considerare la loro effettiva biodisponibilità, che spesso è influenzata da diversi fattori, biotici ed abiotici. Tra i primi la temperatura, il pH e la durezza dell'acqua sono tra i più importanti; per i fattori biotici invece, quelli più importanti sono le modalità con cui si nutrono (filtratori, predatori, tagliuzzatori, raschiatori, collettori, aspiratori) ed il ruolo trofico degli organismi che popolano un determinato habitat. Di conseguenza, le analisi effettuate sul solo sedimento o nella colonna d'acqua non sono sufficienti e non permettono di spiegare gli effetti della contaminazione a medio e lungo termine sulle comunità acquatiche. Le misure dei contaminanti effettuate direttamente sul biota invece, permettono di valutare l'effettiva biodisponibilità degli elementi traccia, contribuendo alla determinazione della reale qualità ecologica di un corso d'acqua. I macroinvertebrati bentonici sono organismi acquatici ampiamente utilizzati nelle pratiche di biomonitoraggio, essendo un importante Elemento di Qualità Biologica (EQB) ai fini della determinazione dello stato ecologico delle acque dolci superficiali, previsto dalla Direttiva Quadro sulle Acque (2000/60/CE). Ad oggi, seppur con una letteratura piuttosto limitata, esistono alcune informazioni circa l'accumulo di metalli traccia in questa componente biotica, che si rivela molto efficace poiché: 1) - la concentrazione dei metalli in essa rilevata appare rapportata a quella del loro ambiente; 2) - i diversi taxa costituenti le comunità presentano cicli vitali sufficientemente lunghi e diversificati, permettendo di fornire un'informazione potenzialmente integrata nel tempo; 3) - i macroinvertebrati occupano tutti i ruoli trofici dei consumatori e sono una fonte di approvvigionamento energetico per altri organismi (quali uccelli e pesci), pertanto potrebbero rappresentare una delle prime fonti di ingresso di una eventuale contaminazione di metalli nelle reti trofiche e permetterebbero di tracciarne la presenza a diversi livelli.

In questo studio sono stati esaminati dei campioni di macrozoobenthos rappresentativi di comunità provenienti da 7 corsi d'acqua della Regione Friuli Venezia Giulia (Province di Pordenone e Udine), con l'obiettivo di determinare il contenuto in metalli traccia (As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn) nei diversi taxa costituenti le comunità.

I risultati hanno permesso di rilevare la presenza di diversi elementi traccia nei campioni rappresentanti le comunità analizzate e di evidenziare correlazioni positive tra le concentrazioni dei metalli osservate e le numerosità di alcuni taxa, con particolare riferimento all'ordine degli Odonati. Ciò è di particolare interesse in relazione al ruolo trofico degli organismi considerati, in quanto predatori ed alla durata del loro ciclo vitale che permetterebbe di accumulare sostanze in misura maggiore rispetto ad altri taxa costituenti le comunità.

Anche dai risultati ottenuti in questo studio, emerge come la valutazione dei contenuti in metalli traccia nelle differenti popolazioni di macrobenthos campionate nei differenti siti, rispecchi la reale situazione di inquinamento ambientale dei siti stessi; l'utilizzo di questa matrice è quindi di assoluta utilità nella valutazione dell'impatto ambientale anche in luoghi in cui la pressione antropica e industriale non rappresenta un pericolo ambientale.

## EFFETTI DELL'INCLUSIONE DI FARINE D'INSETTO (*HERMETIA ILLUCENS*) SUI BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Elia A.C.<sup>1\*</sup>, Prearo M.<sup>2</sup>, Caldaroni B.<sup>1</sup>, Magara G.<sup>1</sup>, Dörr A.J.M.<sup>1</sup>, Scoparo M.<sup>1</sup>, Capucchio M.T.<sup>3</sup>, Righetti M.<sup>2</sup>, Gai F.<sup>4</sup>, Gasco L.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università di Perugia, Via Elce di Sotto 8, 06123 Perugia, Italia;

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino, Italia; <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Largo P. Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), Italia; <sup>4</sup> Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Largo P. Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), Italia;

<sup>5</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Largo P. Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), Italia.

Le farine di pesce (FM) hanno rappresentato per molti decenni la principale fonte di proteine nei mangimi di pesce usati in acquacoltura, grazie all'adeguato profilo aminoacidico, all'alta digeribilità e alla buona palatabilità. Tuttavia, a causa della loro limitata disponibilità ed all'aumento dei costi, nella produzione intensiva vengono sempre più sostituite da altre tipologie di proteine, quali quelle di origine vegetale (es: farina di estrazione di soia) o animale (es: farine di sottoprodotti avicoli). Negli ultimi anni la ricerca scientifica si è focalizzata sulla possibilità di inserire le farine d'insetto nelle diete per i pesci. Gli insetti sono considerati come altamente sostenibili e per composizione nutrizionale essi rappresentano una soddisfacente fonte di nutrienti in termini di aminoacidi, lipidi, vitamine e minerali. Inoltre gli insetti sono una dieta naturale per i pesci d'acqua dolce e marini. Un buon tasso di crescita è già stato riportato per i salmoni dell'Atlantico (*Salmo salar*) o branzini (*Dicentrarchus labrax*) alimentati con diete contenente *Hermetia illucens* o larve di *Tenebrio molitor*. Tuttavia, elevate inclusioni di farine d'insetto nella dieta possono ridurre la crescita dei pesci. E' anche noto che i comportamenti alimentari e le condizioni ambientali possono influenzare l'omeostasi ossidativa di varie specie animale. Lo stress ossidativo è uno dei principali meccanismi coinvolti nelle patologie dei pesci. I cambiamenti di livello dei biomarkers di stress ossidativo possono essere correlati con il catabolismo ossidativo e fattori nutrizionali. Ad oggi i dati sugli effetti dell'inclusione di farine d'insetto sul sistema antiossidante dei pesci in allevamento sono ancora scarsi. Nel presente studio sono stati valutati gli effetti di diete formulate con sostituzioni di farine d'insetto sui livelli di alcuni biomarcatori antiossidanti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Le trote sono state alimentate per 78 giorni con tre diete isoproteiche, isolipidiche ed isoenergetiche contenenti farine di pesce sostituite con 0% (dieta di controllo), 25% (HI<sub>25</sub>) e 50% (HI<sub>50</sub>) di farine parzialmente sgrassate derivate da larve di *Hermetia illucens*, corrispondenti a livelli di inclusione dietetici di 0, 20 e 40%. Ogni dieta è stata somministrata due volte al giorno a quattro gruppi di trote iridea (peso corporeo iniziale: 178,9 ± 9,81 g). I fegati e reni dei soggetti trattati e del controllo sono stati utilizzati per l'analisi biochimica dei principali biomarkers di stress ossidativo (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi, etossiresorufina-O-deetilasi). Sebbene nessun effetto avverso sia stato riscontrato sull'accrescimento di questi pesci, i livelli dei biomarcatori antiossidanti indicano un'alterazione dell'omeostasi ossidativa, soprattutto negli esemplari alimentati con HI<sub>50</sub>. Una ridotta attività enzimatica di glutazione perossidasi di circa il 50% è stata registrata nel rene con ambedue i livelli di inclusione di HI (20 e 40%) e nel fegato con il più alto livello di inclusione (HI<sub>50</sub>). E' stata misurata anche una leggera diminuzione della concentrazione di superossido dismutasi nel rene (HI<sub>50</sub>). Al contrario, l'attività enzimatica di glutazione S-transferasi nel rene e di etossiresorufina-O-deetilasi nel fegato è aumentata a seguito dell'esposizione con HI. Verosimilmente, l'alterazione della risposta antiossidante nelle trote può essere la conseguenza di un danno sia chimico che fisico. Infatti, la chitina, uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli insetti, merita particolare attenzione. Ulteriori indagini sono comunque necessarie per approfondire la conoscenza sugli effetti dell'inclusione di farine d'insetto sui diversi biomarcatori di stress ossidativo nei tessuti delle trote.

## RISULTATI DI 10 ANNI DI MONITORAGGIO SANITARIO IN UNO STABILIMENTO FORNITORE ED UTILIZZATORE DI PESCI DA LABORATORIO

Di Caro G.<sup>1\*</sup>, Lanteri G.<sup>1</sup>, Iaria C.<sup>2</sup>, Pecoraro R.<sup>3</sup>, Guerrera M.C.<sup>1</sup>, Cassata G.<sup>4</sup>, Ciulli S.<sup>5</sup>, Marino F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina; <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Catania, Catania; <sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo; <sup>5</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Bologna;

Nel corso dell'ultimo decennio si è assistito ad un rapido incremento del numero di pesci utilizzati come animali da laboratorio in svariati campi dalla ricerca biomedica, alla formazione ai trial sperimentali volti a fornire supporto al mondo dell'acquacoltura. Nonostante il trend positivo, le informazioni relative allo stato microbiologico e sanitario dei "pesci da laboratorio" negli stabilimenti di ricerca sono piuttosto sporadiche e lacunose. Si registra, infatti, un'importante vuoto cognitivo riguardo i microorganismi patogeni, opportunisti o commensali che potrebbero essere responsabili di un incremento della variabilità biologica tra i pesci utilizzati, per via di modificazioni morfologiche o fisiologiche, così come osservato nei roditori e nel coniglio. Dal 2007 al 2016, 2620 pesci appartenenti a quattro specie di acqua dolce, *Danio rerio*, *Carassius auratus*, *Xiphophorus variatus* e *Poecilia reticulata* e quattro specie marine *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Argyrosomus regius* e *Mugil cephalus*, allevati ed utilizzati a fini sperimentali presso il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS), sono stati esaminati dal servizio di diagnostica dell'Unità di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina, presso il quale i campioni di pesci sono stati sottoposti ad indagine necroscopica, esame parassitologico, istologico, batteriologico, immunoistochimico e molecolare. Tra le diverse malattie diagnostiche, la micobatteriosi è stata la patologia più frequentemente riscontrata con una prevalenza del 14% in *D. rerio*, 31,2 % in *C. auratus*, 6,6% in *X. variatus*, 20% in *P. reticulata* e 17,6% in *M. cephalus*. I quadri clinici osservati erano estremamente eterogenei. Episodi di malattia clinicamente manifesta sono stati rilevati in particolare in *C. auratus*, *X. variatus* e *P. reticulata*, mentre soltanto un focolaio di malattia conclamata è stato registrato nell'area quarantena per uno stock di *D. rerio* acquistati pochi giorni prima e in 15 *M. cephalus* nel corso di un trial sperimentale. *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* sono stati isolati a seguito di due focolai di malattia conclamata accorsi in due diversi partite di *D. labrax* durante il periodo di acclimatazione/quarantena, mentre la diagnosi di diverse patologie subcliniche ad eziologia virale e parassitaria, talvolta esacerbatesi nel corso degli esperimenti, hanno avuto un notevole impatto sulla ricerca in termini di tempo e costi. La malattia linfocistica è stata diagnosticata nel 9,9% delle orate utilizzate, mentre *Cryptocarion irritans*, *Ceratomyxa* sp. ed *Enteromyxum leei* rispettivamente nel 7,7%, nel 21,7% e nel 7,1% dei casi. Infestazioni da *Cryptocarion* sp. sono state registrate nel 7,5% delle bocca d'oro esaminate, *Sphaerospora dicentrarchi* ed *Amyloodinium ocellatum* sono stati osservati rispettivamente nel 19,6% e nello 0,7% dei casi in *D. labrax*, mentre infestazioni da *Myxobolus* sp. sono state diagnosticate nel 25% dei casi in *C. auratus*. Infine particolare interesse hanno destato alcuni inusuali reperti patologici, come le cisti cartilaginee branchiali osservate in 4 zebrafish utilizzati a fini riproduttivi e causate da *Centrocestus* sp. e l'insorgenza di uno schwannoma in uno zebrafish nel corso di un trial sperimentale. I risultati di tale studio, in virtù della nuova normativa sulla sperimentazione animale e dell'obiettivo di ridurre il numero di animali utilizzati a fini sperimentali, potrebbero rappresentare un punto di partenza per l'apertura di un dibattito relativo alle strategie di controllo dei patogeni ed ai limiti legati all'utilizzo, per specifici scopi sperimentali, dei pesci non ottenuti da stabilimenti produttori di animali da laboratorio ed allevati in maniera convenzionale.

## LE MALATTIE NELLE OSTRICHE CONCAVE, *CRASSOSTREA GIGAS*, ALLEVATE IN SARDEGNA: I RISULTATI DI UN ANNO DI INDAGINI

Mandas D.<sup>1</sup> <sup>(#)</sup>, Antuofermo E.<sup>2</sup>, Salati F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Oristano;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Sassari.

L'allevamento delle ostriche *Crassostrea gigas* è un'attività diffusa a livello mondiale, con produzioni importanti in paesi quali Cina, Giappone, Corea del Sud, USA, Messico, Nuova Zelanda, Australia e in molti paesi europei, primo tra i quali la Francia.

Casi di morie sono documentati sin dalla seconda metà del '900 in tutto il mondo e provocano perdite ingenti negli allevamenti, dal 50% fino al 100% del prodotto. Generalmente la causa di queste morie è un insieme di fattori che comprendono la presenza di virus (appartenenti alla famiglia *Herpesviridae*) e di alcune loro varianti genetiche, di fattori ambientali (per esempio temperatura e salinità dell'acqua) e di altri patogeni di origine batterica (*Vibrio splendidus* e *V. aestuarianus*) che, a causa della loro alta patogenicità, sono obiettivo di studi recenti. Questo studio rappresenta un contributo alla conoscenza delle malattie delle ostriche allevate in Sardegna.

I campioni sono stati prelevati a cadenza mensile da quattro zone differenti di un allevamento sito nello stagno di San Teodoro (Sardegna nord-orientale): circa 40 ostriche ogni mese, ripartite in 10 soggetti provenienti da ciascuna area di semina (Zona Rossa, Zona Indaco, Semina di Marzo 2016, Semina di Giugno 2016).

Su ciascuna ostrica è stato eseguito l'esame anatomo-patologico, il prelievo microbiologico dall'epatopancreas e il prelievo di un frammento di branchie/mantello, dai quali è stato estratto il DNA totale per procedere con le analisi molecolari. L'esame microbiologico è stato effettuato per isolare e identificare i batteri della famiglia delle Vibrionaceae (*V. aestuarianus* e *V. splendidus*), noti per l'elevata patogenicità nelle ostriche, mentre il DNA totale estratto ha permesso di ricercare l'Ostreid Herpesvirus con la tecnica di PCR.

Sono state eseguite inoltre le analisi per la valutazione della qualità delle acque in cui sono allevati questi molluschi. Esami chimico-fisici, hanno determinato rispettivamente la salinità, i livelli di nitriti (NO<sub>2</sub>), nitrati (NO<sub>3</sub>) e ammoniaca (NH<sub>4</sub>) con metodiche colorimetriche. Inoltre esami microbiologici, con metodiche di microbiologia classica, hanno determinato la carica batterica totale, i coliformi totali e gli streptococchi fecali oltre alla ricerca della presenza di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Dall'isolamento microbiologico, oltre ai numerosi batteri ascrivibili alla flora microbica ambientale, sono stati isolati alcuni vibriani marini, identificati tra quelli patogeni per le ostriche, *V. aestuarianus* e *V. splendidus*.

Il 56% dei campioni analizzati durante il periodo dello studio è risultato positivo al *Vibrio* spp. e il 26% è stato identificato come *V. aestuarianus*.

Dagli stessi campioni invece non è stata evidenziata la presenza del DNA dell'Ostreid Herpesvirus nonostante fosse il principale patogeno riscontrato fino al 2015. In alcuni casi sono state osservate ostriche con lesioni anatomo-patologiche, e infestazioni di parassiti opportunisti, come il polichete *Polydora ciliata*.

Le analisi chimico-fisiche e microbiologiche dell'acqua inizialmente non hanno mostrato significative anomalie, se non in alcuni periodi dove si sono verificate alterazioni del livello di salinità (da ricondursi a cause meteorologiche), mentre gli ultimi rilevamenti hanno mostrato la presenza di *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, riconducibili probabilmente al malfunzionamento degli impianti di depurazione presenti ed insistenti sullo stagno.

<sup>(#)</sup> Parte della tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari.

# ABSTRACT

## Poster

## PRIMI EPISODI DI KHV IN CARPE KOI (*CYPRINUS CARPIO* VAR. KOI) NELL'ITALIA NORD-OCCIDENTALE

Prearo M.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Angiolillo S.<sup>1</sup>, Biosi T.<sup>1</sup>, De Marco L.<sup>1</sup>, Farina M.<sup>3</sup>, Milla F.<sup>4</sup>, Scagliotti P.<sup>5</sup>, Santi M.<sup>1</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Masoero L.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; <sup>3</sup> Struttura Complessa Sanità Animale, ASL 3 Genovese, Genova; <sup>4</sup> Struttura Semplice Sanità Animale, ASL CNI, Distretto Savigliano-Fossano-Saluzzo, Savigliano (CN); <sup>5</sup> S.O.C. Sanità Animale, ASL AL, Distretto Casale Monferrato (AL); <sup>6</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).

Il Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) o Koi Herpesvirus (KHV), causa una malattia letale altamente contagiosa che colpisce i ciprinidi, in particolar modo la carpa comune e la carpa koi. Questa patologia è considerata emergente ed è inserita nell'elenco delle malattie notificabili secondo l'O.I.E. e la normativa vigente (Direttiva Comunitaria 2006/88 recepita dal D. L.vo 148/2008), soggetta pertanto a denuncia obbligatoria. Presente già in Europa a partire dalla fine degli anni '90 del secolo scorso, in Italia la prima segnalazione è nel 2013 e da allora si sono susseguite numerose altre comunicazioni puntuali riscontrate sempre in piccoli contesti di laghetti di pesca sportiva. Nel 2016 sono state segnalate le prime positività associate a fenomeni di mortalità in carpe selvatiche. L'infezione da KHV spesso causa episodi di mortalità elevata, con gravi alterazioni comportamentali come atassia natatoria, nuoto superficiale, anoressia, letargia e forte dispnea. Con malattia conclamata si evidenziano alterazioni cromatiche della livrea, evidenti soprattutto nelle forme ornamentali, comparsa di aree necrotiche a livello delle lamelle branchiali, a volte molto estese, endoftalmo e riduzione del muco cutaneo. Nel mese di luglio 2017, sui territori piemontese e ligure sono comparsi tre diversi focolai di KHV in carpe koi diversamente stabulate; un primo focolaio, in provincia di Alessandria, ha coinvolto 20 esemplari adulti di carpe koi stabulate in una vasca adiacente ad un laghetto di pesca sportiva senza emissario; un secondo episodio è comparso nell'entroterra genovese dove il virus è stato isolato in un gruppo di 15 riproduttori di carpa koi mantenuti in un piccolo laghetto, anch'esso senza emissari; il terzo focolaio, in provincia di Cuneo, ha coinvolto una quarantina di carpe koi di diversa taglia, da 8 a 20 cm, stabulati in un acquario. Alcuni campioni dei tre diversi siti d'allevamento, sono giunti in tempi diversi presso il laboratorio Specialistico di Ittiopatologia di Torino, direttamente dai diversi proprietari con la richiesta generica di identificare la causa della mortalità osservata. Oltre all'esame anatomopatologico, dove solamente nei campioni di Alessandria e Cuneo si è potuto osservare necrosi branchiale ed endoftalmo su alcuni esemplari, si è proceduto ad effettuare un esame parassitologico, un esame culturale da rene e cervello, un esame virologico tradizionale condotto su monostrati cellulari e un prelievo *ad hoc* di porzioni di branchia per le analisi biomolecolari. I tre campioni sono risultati positivi alle indagini biomolecolari facendo scattare la pratica della notifica agli organi competenti: ASL di riferimento, Regione e Ministero della Salute, con invio del campione per la conferma al Centro di Referenza Nazionale dell'IZS di Legnaro (PD). Tutte le positività sono state confermate, facendo scattare le procedure di campionamento ufficiale da parte degli organismi competenti; dai sopralluoghi effettuati, il focolaio della provincia di Alessandria è stato chiuso in quanto la presenza di ambiente chiuso non comunicante con l'esterno e la mancanza dei pesci che nel frattempo sono tutti deceduti, hanno fatto chiudere la pratica; negli altri due focolai invece sono stati prelevati ufficialmente due nuovi pool di campioni, entrambi risultati positivi alle analisi biomolecolari. L'anamnesi effettuata per tutti i tre focolai ha stabilito che la comparsa della patologia è avvenuta verosimilmente con una movimentazione di pesce incauta, ma comunque i tre focolai non sono risultati epidemiologicamente correlati. Negli allevamenti di Cuneo e Genova, per estinguere il focolaio si è proceduto allo *stamping out* dei soggetti presenti, con successive opere di disinfezione e bonifica.

La movimentazione quindi appare il rischio maggiore per la disseminazione del virus; anche in questi casi, tutti gli episodi sono riconducibili a movimentazioni poco accorte. Il rispetto delle buone pratiche di igiene e biosicurezza, associate ad un maggiore controllo analitico possono giocare un ruolo importantissimo nella prevenzione di questa patologia e nella sua diffusione.



## CONCENTRAZIONE DI CAMPIONI DI ACQUA MARINA PER RICERCA DI BETANODAVIRUS

Toffan A.<sup>1</sup>, Buratin A.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).*

L'encefalo-retinopatia virale (ERV), patologia causata da Betanodavirus, è la principale patologia virale che colpisce le specie marine allevate e non. I Betanodavirus sono dei virus a RNA privi di envelope caratterizzati da una elevata stabilità in ambiente marino. Per la ERV sono state descritte due vie di trasmissione: verticale ed orizzontale. Nel secondo caso, oltre al contatto con pesci malati, è sufficiente il contatto con acqua contaminata per determinare l'instaurarsi dell'infezione in pesci suscettibili.

Poiché nell'ambiente acquatico Betanodavirus tende ad essere estremamente diluito ed il suo rilevamento difficoltoso, è stato messo a punto di un metodo semplice ed efficace di concentrazione virale da campioni di acqua marina. I campioni concentrati possono essere analizzati sia con metodi molecolari che virologici, poiché il metodo qui descritto preserva la vitalità del virus.

Il processo di concentrazione prevede una pre-filtrazione del campione di acqua (1 litro) per eliminare le impurità più grossolane. Il campione filtrato viene poi sottoposto a flocculazione mediante l'aggiunta di 1 mg/litro di Fe-Cl<sub>3</sub> e lasciato in agitazione per 1 ora. Durante questa fase nell'acqua si forma un precipitato di colore giallastro/arancione visibile ad occhio nudo. I flocculi di idrossido di ferro vengono raccolti mediante filtrazione su filtro di policarbonato da 0.8 µm. Il virus è infine liberato dai flocculi di idrossido di ferro mediante incubazione overnight a +4°C con buffer ossalato-EDTA pH6. L'eventuale precipitato ancora presente viene eliminato mediante centrifugazione (3 minuti a 2000 rpm) ed il surnatante così ottenuto può essere inviato direttamente all'analisi in RT-PCR. Nel caso sia necessario procedere con l'isolamento virale per la ricerca di VER, l'eluato viene dializzato per 6 ore a temperatura ambiente attraverso una membrana di cellulosa posta in soluzione di HBSS per ridurre l'osmolarità del campione. In questo modo è possibile inoculare il campione sulla linea cellulare, dopo aggiunta di antibiotici, secondo procedure standard di isolamento virale.

La tecnica di concentrazione virale da campioni di acqua marina qui descritta può trovare molte applicazioni utili: valutazione dell'efficacia dei sistemi di trattamento dei reflui, valutazione dell'efficacia dei sistemi di filtrazione, analisi non-invasive in gruppi di pesci non altrimenti campionabili.

## **PRESENZA DI *CRANGON CRANGON* NUDIVIRUS (CCNV) IN GAMBERO GRIGIO (*CRANGON CRANGON*) NELLA LAGUNA DI MARANO**

Trevisanato R.,<sup>1</sup> Pretto T.,<sup>2</sup> Quaglio F.,<sup>3</sup> Manfrin A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Viale Giuseppe Colombo, 3 – 35131 Padova (PD); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Centro Specialistico Ittico, Via L. Da Vinci 39, 45011 Adria (RO); <sup>3</sup> Dipartimento Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA) Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD).

Il Gambero grigio *Crangon crangon* (Linneo, 1758) è un crostaceo decapode della famiglia Crangonidae, ampiamente diffuso lungo le coste del Mediterraneo e dell'Atlantico Nord-orientale. Si tratta di una risorsa economicamente rilevante, soprattutto nel Nord Europa (Germania, Belgio e Olanda, in special modo), dove raggiunge taglie maggiori rispetto al Mediterraneo, comprese tra i 7 e i 9 cm. Queste taglie sono le più appetibili per l'industria ittica, poiché meglio si prestano ad essere trasformate ma, negli ultimi anni, hanno subito un decremento nel numero di catture.

Questo fenomeno ha stimolato in Belgio tentativi di allevamento di *C. crangon* in impianti intensivi e lo studio delle patologie a cui questa specie è soggetta.

L'analisi delle mortalità osservate durante la fase di stabulazione ha evidenziato la presenza costante di un agente eziologico virale riferibile al genere *Nudivirus* (Bateman and Stentiford, 2017), precedentemente identificato su base morfologica come *Crangon crangon* Bacilliform virus (CcBV). Campionamenti effettuati nel Nord Atlantico, lungo le coste della Gran Bretagna, hanno rilevato la presenza di questo virus nell'epatopancreas della maggioranza degli esemplari selvatici (70-96%).

Dati sulla prevalenza dell'infezione da *Nudivirus* del gambero grigio in Mediterraneo risultavano mancanti. Per valutare la presenza dell'infezione nell'Alto Adriatico si è effettuato un campionamento primaverile presso la località di Marano lagunare. Sono stati prelevati circa 150 esemplari, di cui 100 destinati ad esami molecolari presso l'Università di Gent, 25 fissati in Davidson per analisi istologiche, 5 processati per TEM in colorazione negativa, e il restante numero congelato per analisi molecolari successive (identificazione di specie).

Gli esami istologici hanno evidenziato la presenza di corpi inclusi intranucleari nell'epitelio dei tubuli dell'epatopancreas in tutti i campioni prelevati, in assenza di fenomeni infiammatori associati. I nuclei infetti si presentano ipertrofici con marginazione della cromatina e corpo incluso eosinofilo. La prevalenza delle cellule tubulari affette si attesta sul 10 %  $\pm$  5%.

L'osservazione in colorazione negativa di omogenati di epatopancreas mediante TEM ha evidenziato la presenza di nucleocapsidi con morfologia bastoncellare e dimensioni di 280-285 nm. Inoltre, in accordo con la bibliografia, gli esemplari non mostravano segni di stress o di qualsiasi altro effetto negativo imputabile all'infezione, e, al contrario, lo sviluppo delle uova si mostrava normale. È stato ipotizzato che la patogenicità di questo virus osservata negli impianti in Belgio sia imputabile alle condizioni ambientali stressanti dovute all'allevamento intensivo mentre negli esemplari selvatici il virus si presenta in forma asintomatica.

## MORTALITÀ DA RANAVIRUS E *AEROMONAS HYDROPHILA* IN PESCI GATTO

Ricci E.<sup>1</sup>, Cardeti G.<sup>2</sup>, Fioretti M.<sup>1</sup>, Bossù T.<sup>2</sup>, Cocumelli C.<sup>2</sup>, Toffan A.<sup>3</sup>, Susini F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Pisa (PI); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma; <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).

I Ranavirus (famiglia Iridoviridae) sono virus a DNA a doppio filamento con capside icosaedrico dotato di envelope. L'iridovirosi del pesce gatto è una grave patologia sistemica che colpisce nel periodo primaverile-estivo ed in particolare gli stadi adulti e sub-adulti.

*Aeromonas hydrophila*, è un batterio Gram negativo ampiamente diffuso negli ambienti acquatici. Appartiene, insieme ad *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria*, ai cosiddetti "motile Aeromonads" ed è in grado di causare sindromi setticemico-emorragiche e mortalità in numerosi invertebrati acquatici e varie specie ittiche tra le quali pesce gatto, carpa e pesce persico.

Nel mese di Giugno 2017 sulle sponde del Lago di Bilancino (Barberino del Mugello, FI) si è verificata una moria di pesci gatto (*Ameiurus melas*) di un'unica fascia di età (giovani e subadulti). Il Lago di Bilancino è un invaso alimentato da 6 torrenti, ha una superficie di 5 Km<sup>2</sup>, una profondità massima di 30 m, 10 Km di costa, una temperatura costante di 7-8°C con escursioni da 7 a 28°C nella fascia superficiale. È popolato da numerose specie ittiche (carpa, carassio, cavedano, persico trota, persico sole, persico reale, luccio, barbo, alborella, trota, vairone, pesce gatto) per una biomassa stimabile in 4-5 tonnellate.

Al momento dell'episodio la temperatura dell'acqua era di 26°C, un dato che avvalorava il sospetto di un problema infettivo in quanto ideale per l'attività di alcuni agenti patogeni specie specifici. Su 26 esemplari di pesce gatto pervenuti presso il laboratorio sono stati effettuati gli esami anatomo-patologico, batteriologico, virologico, biomolecolare e istologico.

All'esame autoptico tutti gli animali mostravano petecchie emorragiche e lesioni di tipo ulcerativo a carico della cute, pinne emorragiche ed erose. Un numero limitato di soggetti presentava anche pallore epatico con emorragie puntiformi, splenomegalia, distensione gastrica e intestinale con abbondante essudato catarrale.

All'esame istologico sono state osservate estese lesioni cutanee, con ulcerazione associata ad infiltrato infiammatorio eterofilo, batteri e detriti cellulari; multifocalmente si apprezzavano aree di iperplasia dell'epidermide con, all'interno dei cheratinociti, corpi eosinofili intracitoplasmatici, compatibili con corpi inclusi di origine virale.

L'esame virologico su milza, fegato, rene e sulle lesioni cutanee ha permesso di evidenziare la presenza dello European catfish virus, agente eziologico dell'iridovirosi del pesce gatto, cui è imputabile la mortalità occorsa nella popolazione locale di pesce gatto, resa particolarmente grave dalla contemporanea presenza di *Aeromonas hydrophila*, rilevata in setticemia sui soggetti della moria.

## MORTALITÀ DA *AEROMONAS VERONII* BV *SOBRIA* IN SPIGOLE DI ALLEVAMENTO

Susini F.<sup>1</sup>, Ricci E.<sup>1</sup>, D'Alonzo A.<sup>1</sup>, Cocumelli C.<sup>2</sup>, Zambon M.<sup>3</sup>, Fiocchi E.<sup>3</sup>, Pretto T.<sup>3</sup>, Francalacci C.<sup>4</sup>, Manfrin A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Pisa (PI); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma; <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); <sup>4</sup> Veterinario libero professionista, Livorno (LI)

Nell'ambito del genere *Aeromonas*, *Aeromonas salmonicida* risulta essere la principale specie patogena per numerose specie d'acqua dolce e salata, mentre *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria* rientrano nelle cosiddette "motile Aeromonad species", in grado di causare sindromi setticemico-emorragiche e mortalità variabili in funzione della specie e della virulenza dei diversi sierotipi. Mentre per *Aeromonas hydrophila* il ruolo di patogeno è indiscusso, per quanto riguarda *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria* l'importanza nell'ambito delle malattie batteriche degli organismi acquatici è ancora oggetto di discussione. In bibliografia, *Aeromonas sobria* viene segnalato come agente secondario di infezione, ma esistono alcune segnalazioni di patologie primarie causate da tale germe, descritte in alosa americana (*Dorosoma cepedianum*), spigola (*Dicentrarchus labrax*), persico reale (*Perca fluviatilis*) e storione siberiano.

Durante il periodo Giugno 2016-Febbraio 2017 in provincia di Livorno, in un allevamento di spigole (*Dicentrarchus labrax*) e orate (*Sparus aurata*), si è verificato un episodio di mortalità a stitico, durato alcuni mesi, che ha interessato solo le spigole ed ha comportato gravi perdite economiche per l'allevatore. I soggetti, tutti di peso 700-900 g, erano allevati in vasche a terra (densità allevamento 35 kg/mc) con una produzione totale di 500 t (60% spigole-40% orate).

Dai 12 soggetti consegnati in laboratorio sono stati effettuati gli esami anatomico-patologico, parassitologico, batteriologico e istologico.

All'esame clinico un numero limitato di soggetti presentava letargia, ammassamento in prossimità delle bocchette dell'acqua, nuoto leggermente in superficie, nuoto circolare in estate con picchi di 27°C, in generale comportamento normale e appetito conservato.

All'esame autoptico tutti gli animali presentavano gravi lesioni emorragiche su pinne, cute e organi interni. Da tutti i soggetti esaminati è stato isolato in purezza *Aeromonas veronii* bv *sobria*. Il ceppo è stato confermato mediante analisi biomolecolare. Infine, sia all'esame parassitologico che istologico è stata evidenziata una grave infestazione da *Diplectanum*.

In conclusione, è possibile affermare che anche ceppi di solito scarsamente patogeni per le specie marine, come è il caso di *Aeromonas veronii* bv *sobria*, in particolari condizioni sono in grado di originare episodi di malattia che, se interessano animali a fine ciclo produttivo, a lungo termine possono determinare gravi perdite economiche.

## FENOTIPIZZAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* ISOLATO DA SPECIE ITTICHE ALLEVATE

Fiocchi E.<sup>1</sup>, Zambon M.<sup>1</sup>, Deotto S.<sup>2</sup>, Cocchi M.<sup>2</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro di Referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei - CSI Via L. Da Vinci 39, 45011 Adria (RO); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - SCT4 Friuli Venezia Giulia - Via della Roggia 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD).

*Lactococcus garvieae* è l'agente eziologico della lattococcosi, malattia frequente nei salmonidi e in particolare nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). L'infezione setticemica colpisce i soggetti più grandi causando una mortalità intorno al 30-50%, con una conseguente perdita economica elevata per l'allevatore. Il microorganismo, recentemente, è stato isolato durante i mesi invernali-primaverili, un avvenimento abbastanza insolito, poiché tipicamente la malattia si manifesta a temperature dell'acqua elevate (superiori ai 15-16°C) cioè durante i mesi estivi.

Recentemente, presso il CSI (Centro Specialistico Ittico), sono stati isolati ceppi di *Lactococcus garvieae* in soggetti che provenivano da impianti con temperature dell'acqua intorno ai 12°C e che manifestavano sintomatologia ascrivibile alla lattococcosi.

In seguito alla richiesta da parte degli allevatori del triveneto di approfondire la problematica e visto il probabile cambiamento e adattamento del batterio alle temperature più fredde dell'acqua, il nostro laboratorio ha deciso di collezionare i nuovi ceppi di *Lactococcus garvieae* isolati durante la stagione fredda con temperature dell'acqua non favorevoli al suo sviluppo e di studiarne le caratteristiche fenotipiche e genetiche. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli risultanti dai ceppi presenti nella ceppoteca del CSI isolati da diversi allevamenti del nord Italia durante il corso degli ultimi 5 anni.

Per la fenotipizzazione si è proceduto con lo studio delle caratteristiche morfologiche visionando i microrganismi al microscopio ottico, successivamente è stato utilizzato il sistema API rapid ID 32 STREP della BioMérieux per la loro tipizzazione biochimica ed è stata verificata la loro resistenza alla clindamicina. Per la genotipizzazione si è proceduto con uno studio filogenetico basato sul sequenziamento del gene 16S di ogni singolo ceppo. Infine è stato effettuato lo studio della presenza/assenza della capsula con osservazioni al microscopio ottico, e genotipico, impostando una multiplex PCR per verificare la presenza del gene della capsula.

Lo scopo del lavoro è stato quindi quello di verificare se sia avvenuto qualche cambiamento a livello geno-fenotipico in *L. garvieae* che possa spiegare questa sospetta variabilità delle sue capacità patogenetiche.

In base ai risultati preliminari, che hanno evidenziato alcune differenze a livello fenotipico, come la possibilità di idrolizzare l'ippurato e la presenza/assenza della capsula tra i vari ceppi di *Lactococcus garvieae* isolati nel triveneto, si potranno anche valutare, eventuali correlazioni epidemiologiche tra ceppi vaccinali e ceppi isolati durante focolai di malattia.

## UTILIZZO DELLA TECNICA DELLA MICROAGGLUTINAZIONE SU PIASTRA NELLA VALUTAZIONE ANTICORPALE IN SIERO DI TROTE IRIDEA IMMUNIZZATE CONTRO *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

Canola S.<sup>1,2</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Cavazza G.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,3</sup>, Arsieni P.<sup>1</sup>, Bona M.C.<sup>1</sup>, Sicuro B.<sup>2</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO); <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

Nel contesto dell'acquacoltura italiana, la troicoltura occupa un ruolo fondamentale, fornendo oltre la metà della produzione di pesci allevati. Le malattie batteriche rappresentano i fattori principali di mortalità all'interno di queste realtà produttive, generando parecchie perdite. Fra le problematiche sanitarie più rilevanti citiamo la lattococcosi, il cui agente eziologico è *Lactococcus garvieae*, ampiamente presente negli ambienti idrici di pianura. Nella flora batterica presente nelle acque superficiali si ritrova molto spesso una specie batterica simile, *L. lactis lactis* di cui si hanno solo scarsissime segnalazioni sulla sua patogenicità nei pesci.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di andare a verificare la risposta anticorpale in trota iridea in condizioni controllate, testando tre vaccini stabulogeni, due monovalenti per le specie prese in considerazione e uno bivalente, prodotti a partire da ceppi di *L. garvieae* e *L. lactis lactis* isolati in un allevamento della pianura padana nord-occidentale. Tutti i vaccini testati sono stati somministrati per via intraperitoneale a tre gruppi di trote iridea durante il periodo invernale 2016-2017 (mesi non idonei allo sviluppo della malattia conclamata); successivamente, dopo circa 2 mesi dalla prima immunizzazione, per ciascun lotto sperimentale è stato effettuato un richiamo vaccinale in parte dei pesci debitamente marcati mediante elastomeri.

Lo studio si è svolto a partire da ottobre 2016 a febbraio 2017 su 240 soggetti divisi in quattro gruppi da 60 trote, di cui uno di controllo a cui è stato inoculato PBS. Sono stati effettuati dei prelievi di sangue pre-vaccinazione per verificare la negatività dei soggetti e successivamente post-vaccinazione nel primo mese a cadenza settimanale e successivamente ogni 15 giorni per un totale di 10 prelievi. Tutti i campioni di sangue sono stati sottoposti alla microagglutinazione in piastra utilizzando come antigene gli stessi ceppi utilizzati per la produzione dei vaccini stabulogeni. La prova è stata condotta utilizzando la metodica descritta da Manfrin & coll. (2006) modificata, utilizzando piastre a 96 pozzetti con fondo a U, in cui vengono inseriti 50 µl di PBS in tutti i pozzetti; nel primo pozzetto di ogni riga sono stati aggiunti 50 µl di siero in esame e a partire dal secondo pozzetto sono state effettuate diluizioni scalari in base 2, fino a raggiungere una diluizione finale dell'ultimo pozzetto di 1:1024; su tutti i pozzetti è stato infine aggiunto 50 µl di sospensione batterica avente una D.O. pari a 0,5 a 610 nm; tutti i sieri sono stati testati in doppio. Le piastre così preparate sono state incubate overnight a temperatura ambiente; la lettura è stata condotta mediante l'ausilio di un apposito specchio lettore a luce incidente (Pbi International), considerando come reazione negativa la presenza di un bottone netto e ben definito al fondo del pozzetto e reazione positiva la presenza di torbidità estesa o di un agglutinato irregolare. La lettura è stata condotta da tre operatori distinti per verificare al meglio il grado di attendibilità dei risultati.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di anticorpi sia per *L. garvieae* che per *L. lactis* in tutte le rispettive prove, ottenendo livelli anticorpali maggiori dopo circa 2 mesi dalla vaccinazione e nei soggetti rivaccinati, con agglutinazione evidente alle diluizioni tra 1:16 e 1:64; nella valutazione dei soggetti vaccinati con il vaccino bivalente il risultato è stato del tutto sovrapponibile a quello ottenuto nei soggetti inoculati con i vaccini monovalenti, non verificandosi quindi nessun tipo di effetto sinergico auspicato.

Questa tecnica ha permesso di rilevare il livello di anticorpi agglutinati nei confronti di *L. garvieae* e *L. lactis lactis*, verificando l'andamento anticorpale nei soggetti trattati e valutando la modulazione dell'immunità ottenuta. E' risultata una tecnica veloce e abbastanza affidabile, sicuramente utile per gestire velocemente la valutazione dell'immunità in campo, visto la semplicità tecnica e la rapidità nell'ottenimento dei risultati.

## SCREENING ELETTROFORETICO IN SIERI DI TROTA IRIDEA D'ALLEVAMENTO: DATI PRELIMINARI

Dezzutto D.<sup>1</sup>, Canola S.<sup>1,2</sup>, Barbero R.<sup>1</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Bergagna S.<sup>1</sup>, Gennero M.S.<sup>1</sup>, Arsieni P.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,3</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO); <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

L'elettroforesi delle proteine è un'indagine di laboratorio, spesso sottovalutata, ma di rilevante importanza nell'iter diagnostico e prognostico di alcune patologie. Mediante tale metodica, le proteine sieriche, sottoposte ad un campo elettrico costante, tendono a migrare dividendosi in bande. I tracciati elettroforetici così ottenuti, sono letti attraverso l'utilizzo di un densitometro: le bande proteiche vengono trasformate in picchi di diversa altezza, rispecchiando la quantità proporzionale delle diverse proteine contenute nel siero.

Aumenti o diminuzioni in altezza o nel numero dei picchi, sono da mettere in relazione all'aumento o alla diminuzione patologica o fisiologica delle proteine che li compongono. Oltre alle applicazioni nel settore del benessere animale, la possibilità di dividere le varie classi proteiche è utile al fine dell'interpretazione clinica di determinate patologie conclamate.

Lo scopo di questo lavoro è quello di ottenere un quadro elettroforetico preliminare delle proteine sieriche in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento, per valutare i livelli basali nella specie ittica presa in esame, tenendo conto dell'alta variabilità individuale che si può osservare.

L'elettroforesi delle sieroproteine è stata misurata utilizzando un sistema semi-automatico in gel di agarosio (Sebia Hydrasys®, Evry Cedex, France). Prima dell'utilizzo dello strumento è necessario eseguire un ciclo di lavaggio camera come stabilito dalla ditta produttrice. Successivamente è necessario preparare: 1) una soluzione di lavaggio con 1 flacone (80 ml) in 5 l di acqua distillata; 2) una preparazione decolorante con 5 ml di reattivo in 5 l di acqua distillata; 3) una preparazione colorante Amidoschwarz mediante la miscela del colorante con il diluente e portando a volume finale di 300 ml con acqua distillata. La soluzione colorante è destinata alla colorazione di 10 gels. Terminata la preparazione delle soluzioni, sono stati distribuiti 10 µl di siero di controllo nel primo pozzetto dell'applicatore, 10 µl di siero di controllo ipergamma nel secondo pozzetto dell'applicatore e 10 µl dei campioni in esame nei successivi pozzetti dell'applicatore. Successivamente sono stati aggiunti 150 µl di acqua distillata al centro della camera di migrazione. A questo punto è stata aperta la confezione contenente il gel, è stato asciugato con l'apposita carta bibula ed è stato appoggiato nella camera di migrazione; infine, sono state inserite le spugnette nelle apposite tacche del supporto. Una volta inserito l'applicatore nell'apposita posizione, si è fatta partire la corsa elettroforetica. Una volta terminato il programma, il gel è stato spostato nella camera di colorazione e, infine, trasferito nello scanner per eseguire la lettura.

Sono stati analizzati 144 sieri di trota iridea prelevati da soggetti stabulati in vasche di cemento in un allevamento della provincia di Cuneo. Per ogni soggetto sono stati prelevati 2,5 ml di sangue, il cui siero è stato analizzato come descritto sopra. Le medie ottenute sono di 3,01 g/dL di proteine totali, 0,45 g/dL di albumine, 1,75 g/dL di alfa 1 globuline, 0,54 g/dL, di alfa 2 globuline, 0,17 g/dL di beta globuline e 0,09 g/dL di gamma globuline.

Lo studio ha permesso di tracciare un protidogramma che, seppur caratterizzato da una certa variabilità individuale nella distribuzione delle proteine, causando non poche difficoltà nell'interpretazione, risulta concorde con quanto riportato in bibliografia.

## PRIMA SEGNALEZIONE DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* IN SALMERINO DI FONTE (*SALVELINUS FONTINALIS*) SELVATICO IN AMBIENTE ALPINO

Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Santi M.<sup>1</sup>, Bertoli M.<sup>2</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Di Blasio A.<sup>1</sup>, Bona M.C.<sup>1</sup>, Pizzul E.<sup>2</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

Nella primavera del 2017 è iniziato il progetto di ricerca dal titolo “Laghi alpini: indicatori dei cambiamenti globali” di cui il Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia dell'IZSPLV è capofila. Il salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*) è un salmonide alloctono, originario del Nord America, che è stato introdotto in diversi laghi alpini d'alta quota del Nord Italia, quando ancora non vi erano molte informazioni sul potenziale danno ecologico derivante dall'introduzione di questa specie. Tra gli obiettivi del progetto, oltre alla valutazione dell'impatto dei cambiamenti climatici sulla comunità acquatica, è previsto anche il monitoraggio sanitario della fauna ittica che popola questi ambienti estremi e di cui, ad oggi, si hanno scarse notizie. Il sito selezionato è il lago sottano della Balma (Alpi Cozie, Comune di Coazze -TO), situato a 2.100 m s.l.m. all'interno del Parco Orsiera-Rocciavère. Per il campionamento ittico si è proceduto con la cattura di 30 esemplari di salmerino di fonte mediante l'utilizzo di reti multimaglia branchiali pelagiche. Gli esemplari sono stati stoccati in contenitori di plastica e successivamente soppressi mediante un'overdose di MS-222. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esami biometrici (peso e lunghezza) seguiti da un esame anatomopatologico e da un esame batteriologico eseguito utilizzando terreni di primo isolamento (Agar Sangue e Tryptic Soy Agar). Tutte le colonie cresciute sono state selezionate, clonate e classificate mediante prove fenotipiche, utilizzando terreni selettivi e biochimiche utilizzando le gallerie API 20E, 20NE, rapid ID32 e API 20STREP (bioMérieux). L'esame colturale è risultato positivo in 2 individui. Le specie isolate sono state: *Yersinia ruckeri* e *Lactococcus garvieae*. Mentre *Y. ruckeri* è già stata segnalata in questa specie, l'isolamento di *L. garvieae* rappresenta la prima segnalazione in salmerino di fonte, anche se il soggetto non presentava i classici segni clinici della patologia. E' piuttosto sorprendente questa segnalazione, seppur spiegabile attraverso due possibili ipotesi: la prima, maggiormente plausibile, in cui *L. garvieae* sarebbe giunto nel lago grazie all'attività di alpeggio nel periodo estivo (con la pratica della transumanza in malga), dove i bovini utilizzano il lago anche per abbeverarsi. Nei bovini infatti, *L. garvieae* è spesso isolato e può causare diverse forme cliniche di mastite. La seconda ipotesi, invece, anche se meno probabile, ma più suggestiva, poiché il lago è raggiungibile solo a piedi in circa tre ore di cammino, è quella in cui alcuni pescatori, senza nessuna autorizzazione, abbiano introdotto una partita di salmerini provenienti da un impianto di pianura infetto: questa ipotesi potrebbe avvalorare anche il ritrovamento di *Y. ruckeri*. Sono pertanto in corso delle indagini di biologia molecolare proprio con lo scopo di confrontare il ceppo isolato nel salmerino con alcuni ceppi isolati in bovini e ceppi di campo prelevati in impianti di acquacoltura, in modo da confermare o smentire le ipotesi da noi formulate. Questa comunicazione riveste un'importanza notevole per la segnalazione stessa nel salmerino di fonte, ma soprattutto per ribadire l'importanza che rivestono i monitoraggi sanitari che dovrebbero essere estesi sia su tutti gli ambienti lacustri pedemontani e alpini che negli ambienti fluviali, onde determinare il reale stato di salute delle popolazioni ittiche, gestendo il rischio correlato agli eventuali isolamenti di patogeni e garantendo un maggiore controllo sulle popolazioni selvatiche.



## UN EPISODIO D'INFEZIONE SISTEMICA DA *SHEWANELLA PUTREFACIENS* GROUP IN CARPE KOI (*Cyprinus carpio*, L.)

De Zan G., Deotto S., Di Giusto T., Pascoli F., Toffan A., Cocchi M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

*Shewanella* (*S.*) *putrefaciens* group è un microrganismo appartenente alla famiglia delle *Alteromonadaceae* tradizionalmente considerato alofilo. Alcuni ceppi sono tuttavia in grado di adattarsi agli ambienti dulciacquicoli e risultano attualmente in diffusione in diversi ecosistemi. Batterio saprofita e raramente patogeno, risulta comune causa di *spoilage* dei prodotti di origine animale. Sebbene i meccanismi di patogenicità non siano ancora stati ad oggi chiariti e le infezioni siano spesso di tipo polimicrobico, sono stati osservati diversi fattori di virulenza. Nell'uomo, questo microrganismo è ritenuto un patogeno opportunistico associato a forme d'infezione con ampio spettro clinico. Nei pesci, oltre a far parte della normale flora branchiale ed intestinale, è ormai considerato un agente eziologico opportunistico emergente, causa di patologia significativa sia in specie d'acqua dolce, sia salata, in alcune specie selvatiche e in pesci ornamentali (shewanellosi).

Il presente caso riporta un episodio di shewanellosi sistemica in carpe Koi (*Cyprinus carpio*) riferite al Servizio Diagnostico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (SCT4 Udine) in seguito ad un episodio di mortalità (5/30 soggetti) che aveva coinvolto gli esemplari più vecchi del gruppo. I due soggetti esaminati si presentavano in stato di nutrizione non ottimale e con enoftalmo bilaterale. Il principale reperto macroscopico era caratterizzato da uno stato edematoso generalizzato che risultava particolarmente grave in sede addominale, in associazione ad estese aderenze viscerali ed imponente ascite. Era inoltre presente lieve nefromegalia. In base all'anamnesi e alle lesioni anatomopatologiche rinvenute sono stati allestiti esami virologici, batteriologici e parassitologici. Nel primo caso, è stato considerato in diagnosi differenziale il Carp Edema virus, la cui ricerca ha dato però esito negativo, così come la ricerca per Koi Herpes virus. L'esame batteriologico, invece, condotto da intestino, fegato e milza ha permesso di isolare *S. putrefaciens* group insieme a *Aeromonas sobria*, mentre da rene, cute e sistema nervoso centrale è stato identificato *S. putrefaciens* group in purezza. Da ultimo, gli esami parassitologici hanno evidenziato la presenza di una bassa carica di *Gyrodactylus* spp. da cute e branchie.

Come riportato in letteratura, il caso descritto conferma *S. putrefaciens* group come un potenziale agente d'infezione polimicrobica sistemica nelle specie ittiche, in apparente espansione anche nelle specie ornamentali e negli ambienti dulciacquicoli. Gli aspetti anatomopatologici descritti risultano tuttavia insoliti rispetto a quanto riscontrato in letteratura dato che questo microrganismo si manifesta generalmente con lesioni cutanee necrotico-ulcerative, occasionalmente associate ad aspetti emorragici e setticemici in sede viscerale. Casi di ascite ed edema sono invece riportati nelle infezioni sperimentali e raramente in quelle naturali (ad esempio cobite ed anguilla).

## NOTA SU NUOVI PATOGENI DI ORIGINE BATTERICA IN STORIONI D'ALLEVAMENTO

Prearo M.<sup>1</sup>, Santi M.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Scanzio T.<sup>3</sup>, Pedron C.<sup>4</sup>, Bona M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; <sup>3</sup> Biologo, Cislano (MI); <sup>4</sup> Medico Veterinario, Settala (MI).

L'importanza degli storioni in acquacoltura è aumentata enormemente negli ultimi venti anni, soprattutto per la sempre più alta richiesta di caviale sul mercato globale. I principali paesi che producono caviale sono la Russia, l'Iran, gli Stati Uniti, la Cina ed alcuni Stati membri dell'UE, tra cui Francia, Germania, Spagna e l'Italia, il quale è il primo produttore a livello Europeo con 38 tonnellate di caviale prodotte nel 2016. In Italia molte sono le specie di storioni allevate; in particolare quelli maggiormente presenti negli allevamenti sono lo storione bianco (*Acipenser transmontanus*), lo storione russo (*A. gueldenstaedtii*), lo storione siberiano (*A. baerii*), lo storione Adriatico (*A. naccarii*), lo sterleto (*A. ruthenus*) e in misura minore lo storione Ladano (*Huso huso*), che rappresenta il più grande pesce d'acqua dolce esistente e da un punto di vista commerciale il suo caviale è il più raro e di maggior pregio e valore. Tuttavia l'allevamento dello storione è considerato ancora agli inizi, soprattutto se comparato ad altre realtà d'allevamento come quella del salmone atlantico (*Salmo salar*) e della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*): poche sono le informazioni disponibili riguardanti le malattie ed il controllo sanitario e che quindi possono rappresentare un limite per questa attività. Lo stress dovuto all'allevamento intensivo espone spesso gli storioni a numerose malattie, causate da parassiti, batteri e virus. Mentre le malattie virali che colpiscono gli storioni sono considerate infezioni primarie, le malattie batteriche fino ad oggi segnalate sono solitamente causate da patogeni opportunisti, che comunque possono portare alte mortalità e conseguentemente causare pesanti perdite economiche. Al fine di incrementare le conoscenze sulle patologie che affliggano gli allevamenti di storioni del nord Italia è stato condotto un monitoraggio tra il 2009 e il 2017 mirato alla ricerca di agenti batterici in alcuni allevamenti del Nord Italia, campionando 858 soggetti di diverse specie e taglia: il numero più consistente di soggetti esaminati è stato per lo storione russo e siberiano; le altre specie sono state esaminate in numero decisamente più ridotto. Tutti i soggetti campionati sono stati sottoposti ad esame necroscopico per rilevare la eventuale presenza di lesioni o altre alterazioni patologiche. In seguito è stato eseguito l'esame batteriologico con prelievo in sterilità a livello di rene e semina su terreni di primo isolamento (Columbia Blood Agar o Tryptic Soy Agar). Dopo 24-72 h di incubazione a 22±2°C, le colonie eventualmente cresciute sono state selezionate, clonate ed identificate mediante prove fenotipiche su terreni selettivi e tramite test biochimici (API test, bioMérieux). Su 858 soggetti, 297 (34,61%) sono risultati positivi con crescita batterica. I batteri identificati sono stati isolati con diverse prevalenze: *Aeromonas hydrophila* con percentuali pari al 37,71%, *Plesiomonas shigelloides* con il 17,17%, *Aeromonas sobria* con il 10,77%, *Pseudomonas* spp. con il 6,06% e *Acinetobacter* spp. con il 3,42%; valori di prevalenza inferiori sono stati riscontrati per *Citrobacter* spp., *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio* spp., *Flavobacterium* spp. e *Chryseomonas* spp.. La presenza di infezioni miste è stata osservata in un basso numero di casi in cui la compromissione ambientale di allevamento era elevata. *A. hydrophila* è la specie batterica maggiormente isolata, ma solitamente è associata a sovraffollamento in vasca, alte temperature, manipolazione mal eseguite, basso livello di ossigeno o scarso stato nutrizionale. *A. hydrophila* è caratterizzata da un basso livello di patogenicità, ma a volte, in pesci particolarmente stressati o traumatizzati, può provocare gravi danni.

Da rimarcare, in base ai riscontri della recente bibliografia scientifica, come siano considerabili prime segnalazioni *Yersinia ruckeri* e *Aeromonas hydrophila* in *Huso huso*, *Plesiomonas shigelloides* in *A. baerii* ed *A. sobria*, *P. shigelloides* e *Y. ruckeri* in *A. gueldenstaedtii*. Si può affermare come queste conoscenze acquisite nel corso degli anni siano fondamentali per la creazione di un data base riguardante i patogeni che colpiscono le diverse specie di storioni allevati in Italia e la futura gestione sanitaria più equilibrata e consapevole degli allevamenti.

## **FATTORI DI VIRULENZA IN *VIBRIO CHOLERAE* NON O1 E NON O139 E IN *VIBRIO MIMICUS* ISOLATI DA PESCI ORNAMENTALI**

Zago V.<sup>1</sup>, Zambon M.<sup>1</sup>, Civettini M.<sup>1</sup>, Zaltum O.<sup>1</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei – CSI Adria (RO).

Negli ultimi vent'anni i pesci ornamentali sono risultati una delle categorie di pet maggiormente diffuse in Europa, con milioni di esemplari introdotti annualmente in molti Stati membri, Italia inclusa. Nel presente lavoro abbiamo valutato la potenziale patogenicità e l'eventuale rischio zoonosico di 53 ceppi di *Vibrio cholerae* non O1/non O139 e di un ceppo di *Vibrio mimicus* isolati da pesci ornamentali, la maggior parte provenienti dal sud-est asiatico, tra il 2000 e il 2015. Tutti i ceppi sono stati prima identificati biochimicamente, geneticamente e tramite MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight) e successivamente sottoposti alla ricerca di fattori di virulenza come ctxA (cholera enterotoxin subunit A), ace (accessory cholera enterotoxin), zot (zona occludens toxin), stn/sto (salmonella-like enterotoxin/heat stable toxin), toxR (toxin regulated factor R), rtxA (repeat in toxin A), hlyA (haemolysin A) e tcpA (toxin coregulated pilus A) tramite PCR multiplex e singola endpoint.

21 dei 54 ceppi testati possedevano almeno uno dei fattori di virulenza, in particolare i geni toxR, rtxA e hlyA. Il ceppo di *Vibrio mimicus*, inoltre, era dotato di particolari fattori di virulenza (tcpA) che ne aumentano la patogenicità. Sebbene queste enterotossine possano causare sporadici episodi di gastroenterite, il potenziale zoonosico di questi ceppi, considerati non patogeni da precedenti indagini genetiche, andrebbe tenuto in maggior considerazione e monitorato nel tempo. Grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare, infatti, è stato possibile individuare dei nuovi fattori di virulenza finora sconosciuti e rivalutare la potenziale patogenicità di tali ceppi. Sarebbe interessante, infine, testarne la patogenicità per le principali specie di pesci ornamentali, mediante prove di infezione sperimentale in condizioni controllate, anche se da precedenti esperienze effettuate presso l'acquario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie su *Carassius auratus* non sono emersi dati interessanti che possano confermare la virulenza di alcuni di questi ceppi per tale specie, molto comune in questo specifico settore animale.

## VALUTAZIONE DI PARTE DELLA FLORA BATTERICA INTESTINALE COLTIVABILE IN CICLIDI MBUNA MEDIANTE MALDI-TOF

Righetti M.<sup>1</sup>, Santi M.<sup>1</sup>, Mugetti D.<sup>1,2</sup>, Pastorino P.<sup>1,3</sup>, Esposito G.<sup>4</sup>, Piga S.<sup>5</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Corso di Laurea in Biotecnologie Veterinarie, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; <sup>4</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari; <sup>5</sup> Bioparco Zoom Torino, Cumiana (TO).

Fin dai primi anni '80, la spettrofotometria di massa si è distinta per essere un'ottima tecnica per l'analisi e la caratterizzazione delle proteine nell'ambito della ricerca. Ultimamente, questa metodologia ha trovato applicazione nell'identificazione di batteri, in particolare tramite il Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Il MALDI-TOF è una metodica precisa, rapida ed economicamente conveniente per l'identificazione di cellule batteriche integre, se comparata alle convenzionali tecniche d'identificazione fenotipica e biomolecolare. Inoltre è in grado di identificare batteri direttamente da campioni clinici. Per tale ragione è stata utilizzata per la prima volta nella caratterizzazione di parte della flora microbica intestinale coltivabile di ciclidi Mbuna provenienti da un parco acquatico del nord Italia.

In totale sono stati analizzati 95 esemplari di diversi ciclidi mbuna, ma tutti stabulati nella medesima vasca, i quali sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, esame parassitologico esterno ed interno e esame colturale dall'intestino e dal rene. Ciascun intestino è stato isolato, in modo sterile e posto in terreno liquido di primo isolamento (Brain Heart Infusion Broth - BHI broth) ed incubato per 24 ore a 22±2°C. Verificata l'avvenuta crescita, sono state effettuate diluizioni scalari 1:10 dal brodo madre fino alla concentrazione di 1x10<sup>-9</sup>. Per le ultime 3 diluizioni è stato prelevato 1 ml di sospensione batterica e seminato su agar sangue per spatolamento. In seguito, dopo 48-72 ore, in base alla morfologia delle singole colonie cresciute, sono state selezionate e clonate diverse colonie su agar sangue e successivamente sottoposte all'identificazione con MALDI-TOF. Questa metodica fornisce un'identificazione percentuale da 1% a 99,9% in base al grado di similarità con lo spettro presente in banca dati: nel presente studio sono state ritenute valide le identificazioni effettuate con un ID superiore al 98%; valori inferiori sono stati verificati con metodiche biochimiche (API System, bioMérieux) o biomolecolari.

Tutti gli intestini dei pesci analizzati sono risultati positivi e i diversi batteri coltivabili isolati sono stati: *Aeromonas hydrophila* (36 soggetti), *Citrobacter* spp. (29 soggetti), *A. sobria* (22 soggetti), *C. freundii* (18 soggetti), *Plesiomonas shigelloides* (12 soggetti), *Pseudomonas putida* (11 soggetti), *Edwardsiella tarda* (10 soggetti), *A. veronii* (9 soggetti), *P. fluorescens* (5 soggetti), *Lactococcus lactis* (3 soggetti), *L. garvieae* (1 soggetto) ed *Acinetobacter johnsoni* (1 soggetto).

Questa prima caratterizzazione del microbioma dei ciclidi in oggetto, porta a descrivere un quadro di flora batterica abbastanza eterogenea, presente normalmente anche a livello ambientale; alcune specie batteriche possono rivestire un ruolo patogeno importante diretto come nel caso di *L. garvieae* od un ruolo secondario, qualora subentrino problematiche stressogene o patologiche, come per *E. tarda*, *P. shigelloides*, *A. hydrophila* e *A. sobria*. Resta la valutazione di tutta la flora batterica intestinale non direttamente coltivabile che potrà essere studiata solamente mediante tecniche omiche di ultima generazione (NGS).

Questo studio seppur preliminare e con dati molto parziali, mette in luce la estrema variabilità della flora batterica intestinale che varia sia in base alla specie ittiche che all'ambiente e all'alimentazione. In questo caso l'ambiente e l'alimentazione sono delle variabili costanti che non modificano il risultato; resta da valutare l'incidenza della specie ittica nella caratterizzazione del profilo batterico. Questi studi rappresentano un passo avanti nella conoscenza di possibili interazioni tra flora intestinale e possibili patogeni.

In conclusione, anche secondo questo studio il MALDI-TOF rappresenta una valida tecnica per l'identificazione batterica; resta da implementare comunque il data base disponibile nelle diverse attrezzature proposte, per aumentare la base dei profili di specie batteriche particolari.

## POTENZIALE TRASFERIMENTO DI *SAPROLEGNIA* SPP. DALL'ALLEVAMENTO ALL'AMBIENTE SELVATICO: RISULTATI PRELIMINARI

Galuppi R.<sup>1</sup>, Sandoval-Sierra J.V.<sup>2</sup>, Cainero M.<sup>1</sup>, Menconi V.<sup>1</sup>, Tedesco P.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>1\*</sup>, Diéguez Uribeondo J.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma mater Studiorum - Università di Bologna; <sup>2</sup> Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Real Jardín Botánico (CSIC-RJB), Madrid

La saprolegniosi è considerata un'infezione ubiquitaria all'interno dell'ecosistema dulciacquicolo, con diffusione sia nei fiumi che negli allevamenti (Willoughby & Pickering, 1977). L'agente eziologico, *Saprolegnia* spp., è considerato un patogeno opportunista facoltativo e molto spesso le condizioni di allevamento possono contribuire a creare situazioni favorevoli all'instaurarsi dell'infezione nella popolazione. Allo scopo di valutare il potenziale trasferimento di *Saprolegnia* spp. dai pesci allevati a quelli selvatici e viceversa è stata effettuata un'indagine in 2 allevamenti di trota iridea (in provincia di Vicenza e di Bolzano), in 2 allevamenti di trota fario e marmorata (in provincia di Udine e Pordenone) e nei sistemi idrici tributari ed effluenti dagli stessi allevamenti. Sono stati effettuati due campionamenti: il primo in autunno/inverno e il secondo in inverno-primavera, periodi di maggiore emergenza della saprolegniosi negli allevamenti di salmonidi. Nel corso di ciascun campionamento, da ogni allevamento sono stati prelevati 10 trote, preferibilmente con lesioni riferibili a Saprolegniosi; quando possibile altrettanti pesci, con o senza lesioni, sono stati prelevati nelle acque libere sia monte che a valle di ciascun allevamento. In ciascun sito di campionamento sono inoltre state collocate 5 trappole di rete metallica contenenti ciascuna 7 porzioni di semi di canapa precedentemente sterilizzate (Seymour, 1970; Johnson *et al.*, 2002), che sono stati lasciati *in situ* per almeno 10 giorni e poi raccolte. Due frammenti di micelio, per quanto riguarda i pesci con lesioni, un pezzetto di pinna dorsale e di branchia per i pesci senza lesioni, e tutti i semi di canapa recuperati dalle trappole sono stati seminati su glucose-yeast extract agar (Min *et al.*, 1994) addizionato di penicillina (6 mg/l) e acido ossolinico (10/mg/l) (Alderman & Polglase, 1986) (GY+P+OX). Gli isolati ottenuti sono stati inviati al CSIC-RJB, Spagna, per le analisi molecolari volte alla loro identificazione a livello di specie (Sandoval-Sierra *et al.*, 2014). Da 81 pesci campionati negli allevamenti sono stati ottenuti 61 isolati, mentre dai 27 pesci selvatici catturati a monte e dai 45 a valle, quasi tutti senza lesioni, si sono ottenuti rispettivamente 9 e 17 isolati. La specie di oomiceti riscontrata con maggior frequenza è stata *Saprolegnia parasitica* (78,6%), mentre altre specie sono state trovate più raramente. Dai 463 semi di canapa messe in coltura sono stati ottenuti 415 isolati, con *Saprolegnia ferax* quale specie più frequente (31,3%). Sebbene la composizione delle specie riscontrata in allevamento, nelle acque a monte e a valle dello stesso e nei pesci senza lesioni, sia risultata simile, nei pesci con lesioni si è osservata una maggiore prevalenza di *S. parasitica*. In un allevamento della provincia di Bolzano dove la saprolegniosi non veniva ritenuta un problema sanitario, *S. parasitica* è stata isolata solo da un pesce selvatico senza lesioni catturato a valle dell'impianto, in una zona dove venivano introdotti salmonidi per ripopolamento. Questa pratica potrebbe quindi rappresentare un rischio per la trasmissione di *Saprolegnia* alle popolazioni selvatiche, come già ipotizzato in altri studi. La genotipizzazione dei ceppi isolati, ancora in corso, sarà utile a chiarire meglio la circolazione di *Saprolegnia* spp. negli ambienti in studio, permettendo di definire le interazioni esistenti tra popolazioni allevate e selvatiche nella trasmissione di questo oomicete. Il lavoro ha comunque evidenziato come il metodo delle trappole con semi di canapa possa essere utile nell'ambito di studi epidemiologici sulla diffusione di *Saprolegnia* spp., in quanto permette di evitare o limitare tecniche invasive sui pesci e superare i problemi di campionamento dei pesci selvatici.

La bibliografia è disponibile presso gli autori

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*

## STUDIO ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCIMICO SULLA REATTIVITÀ BRANCHIALE DEL BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALL'INFEZIONE DA *AMYLOODINIUM OCELLATUM*

Volpatti D.<sup>1</sup>, Massimo M.<sup>1</sup>, Bulfon C.<sup>1</sup>, Beraldo P.<sup>1</sup>, Zanolla S.<sup>1</sup>, Byadgi O.<sup>1</sup>, Ronza P.<sup>2</sup>, Magi G.E.<sup>3</sup>, Galeotti M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali (DI4A), Università di Udine; <sup>2</sup> Dipartimento di Anatomia, Produzioni Animali e Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Santiago de Compostela. Spagna; <sup>3</sup> Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino.

Lo studio è stato finalizzato a localizzare e a descrivere le popolazioni cellulari che risultano reclutate e alcuni mediatori del processo infiammatorio che sono attivati in risposta all'infezione da *A. ocellatum* (AO) nel branzino (*D. labrax*), con particolare riferimento al tessuto branchiale. A tale proposito campioni di branchie sono stati prelevati nel corso di episodi di malattia spontanea e di malattia indotta sperimentalmente presso gli acquari della sezione di Scienze Animali e Veterinarie (DI4A) dell'Università di Udine. Il tessuto è stato immediatamente fissato in soluzione di Bouin e processato al fine di ottenere sezioni istologiche di 4 µm, poi colorate con E.E./PAS/Tricromica o alternativamente sottoposte a metodica immunoistochimica. Quest'ultima è stata realizzata mediante un sistema di rivelazione HRP anti-rabbit o anti -mouse (EnVision™ FLEX, Dako) e cromogeno DAB. La procedura ha previsto un preliminare smascheramento dell'antigene con High pH o Low pH solution (Dako) e l'uso di un pannello di anticorpi mono- e poli-clonali specifici per i seguenti antigeni: Ossido Nitrico Sintasi inducibile (iNOS) (RB-1605, Thermo Scientific); Citocromo P450 (CYP1A) (CO-226, Biosense Laboratories); GM-CSF Rα (sc-690, Santa Cruz Biotech); IgM di branzino (policlonale da coniglio, Univ. di Trieste); CD35 (N-19, sc-7640, Santa Cruz Biotech.); CD16 (H-80, sc-20627, Santa Cruz Biotech.); TNF-α (ab6671, Abcam); TLR4 (76B357, Imgenex), TLR2 (ab1655, Abcam). Questi marcatori sono stati selezionati sulla base della loro rilevanza quali indicatori di risposta infiammatoria e alla luce della loro comprovata reattività nei confronti dei tessuti del branzino. Le stesse analisi sono state condotte anche su campioni di branchie prelevati da soggetti di controllo sani.

Istologicamente è stato possibile osservare numerosi trofonti adesi alle lamelle secondarie, nonché l'evidente modificazione dell'architettura branchiale, caratterizzata soprattutto da iperplasia delle cellule epiteliali con conseguente fusione delle lamelle secondarie. In tale contesto l'immunomarcatura ha evidenziato che gli anticorpi per iNOS, GM-CSF Rα, TLR4, TLR2, CD16 identificano popolazioni cellulari riferibili a macrofagi, mentre l'anticorpo per TNF-α consente di immunolocalizzare i monociti circolanti e l'endotelio vasale. Diversamente la positività per CYP1A riguarda le cellule epiteliali, piuttosto che le cellule simil-macrofagiche. L'anticorpo policlonale per le IgM ha marcato le plasmacellule e talvolta alcune cellule assimilabili a macrofagi. TNF-α e iNOS hanno marcato anche il parassita (in particolare i trofonti allo stadio precoce di adesione), saranno perciò necessari alcuni approfondimenti per analizzare le ragioni di tale reattività. In merito alla reattività dell'ospite i nostri risultati preliminari suggeriscono che nel tessuto branchiale la risposta innata inizia tramite il coinvolgimento di cellule simil-macrofagiche positive per i PRRs, ovvero i pattern recognition receptors TLR4 and TLR2. Esse sono prevalentemente localizzate nelle porzioni infiammate e iperplastiche delle branchie parassitate. Si ritiene che AO, similmente ad altri protozoi, possa stimolare la risposta immunitaria attraverso l'attivazione dei TLRs e la conseguente produzione di citochine e altri mediatori dell'infiammazione quali la forma inducibile della NO sintasi, evidenziata nell'epitelio branchiale mediante marcatura con l'anticorpo specifico.

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*

## PRIMA SEGNALEZIONE DI MALATTIA NODULARE BRANCHIALE NELLA TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA* L.)

Perolo A.<sup>1</sup>, Accini A.<sup>2</sup>, Lunelli F.<sup>3</sup>, Dalla Pozza M.<sup>4</sup>, Gustinelli A.<sup>5</sup>, Menconi V.<sup>5</sup>, Fioravanti M.L.<sup>5</sup>, Quaglio F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD); <sup>2</sup> Skretting Italia, Mozzecane (VR); <sup>3</sup> Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN); <sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); <sup>5</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO).

La malattia nodulare branchiale (NGD) rappresenta uno dei maggiori problemi sanitari negli allevamenti italiani di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Episodi di NGD sono stati descritti in passato in salmerini alpini (*Salvelinus alpinus*) e salmoni reali (*Oncorhynchus tshawytscha*) allevati in acqua dolce. A marzo 2017, durante un monitoraggio di NGD in trote iridee nella Provincia di Trento, sono stati osservati i primi casi di malattia nodulare branchiale nella trota fario.

Le trote fario infette provenivano da due allevamenti dove erano contemporaneamente presenti episodi di NGD nelle trote iridee. I pesci, di taglia compresa tra i 20-25 g (vasca 1) e 40-45 g (vasca 2), venivano allevati in vasche a fondo naturale alimentate con acqua di pozzo e sorgente. La temperatura dell'acqua variava da 5,5 a 7,2°C nella vasca 1 e da 8,9 a 11,2°C nella vasca 2.

Da ogni vasca sono stati prelevati mensilmente 25 pesci a marzo, aprile e maggio 2017 per un totale di 150 soggetti. Le trote sono state sottoposte ad esami necroscopici ed analisi microscopiche. Le branchie sono state sezionate e fissate in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico. In seguito i campioni sono stati processati, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con soluzione di Giemsa.

Le trote fario osservate in vasca non mostravano né grave sintomatologia respiratoria né alte mortalità tipiche di NGD nelle trote iridee. In 53 pesci su 150 sono state osservate branchie dall'aspetto rigonfio e pallido con presenza di noduli biancastri lungo gli apici dei filamenti.

Microscopicamente le branchie colpite mostravano reazioni proliferative a carico dei filamenti con fusione delle lamelle, specialmente nelle porzioni distali. Le lesioni descritte, sia a livello macroscopico che microscopico, erano tipiche delle infezioni da NGD.

L'esame microscopico ha permesso di osservare trofozoiti di amebe (di diametro di circa 15 x 20 µm) lungo la superficie dei filamenti iperplastici.

Le analisi istologiche hanno evidenziato iperplasia ed ipertrofia dell'epitelio branchiale e delle cellule mucipare, necrosi e presenza di amebe lungo la superficie dei filamenti in 32 trote su 150 campionate.

Nonostante l'assenza di gravi sintomatologie respiratorie e di alte mortalità, le alterazioni proliferative delle branchie associate alla presenza di amebe hanno mostrato come anche la trota fario possa essere interessata dalla malattia nodulare branchiale. Ulteriori studi appaiono necessari per chiarire gli aspetti eziopatogenetici della NGD in questa specie ed il suo coinvolgimento nella diffusione della patologia nelle trotilcolture italiane.

## **PRESENZA DI *CYSTIDICOLA FARIONIS* IN TROTE IRIDEA ALLEVATE: UN POSSIBILE AMPLIAMENTO DELL'AREALE CONOSCIUTO?**

Santi M.<sup>1</sup>, Cavazza G.<sup>1</sup>, Righetti M.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Saragaglia C.<sup>1</sup>, Arsieni P.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

I nematodi del genere *Cystidicola* (Fisher 1798) sono parassiti che colpiscono la vescica natatoria dei pesci fisostomi dell'emisfero settentrionale. Due sono le specie attualmente riconosciute appartenenti a questo genere, *C. farionis*, presente in Eurasia e Nord America e *C. stigmatura*, presente esclusivamente in Nord America. Sono parassiti caratterizzati da un ciclo biologico eteroxeno, che prevede il coinvolgimento di minimo due ospiti, in particolare un ospite intermedio invertebrato, ossia un crostaceo anfipode e un ospite definitivo rappresentato da pesci fisostomi. Questi parassiti tramite la produzione di tossine e il movimento all'interno della vescica natatoria, causano la distruzione della parete della stessa, con conseguente possibile alterazione nell'assetto natatorio del pesce. In Italia *C. farionis* è stata riportata per la prima volta nel 2006 in salmonidi selvatici (trote iridea, trota fario, trota marmorata) nel fiume Adige in provincia di Bolzano; in seguito, tra il 2012 e 2013, sono state eseguite ulteriori indagini parassitologiche per la verifica della presenza di *C. farionis* sia su salmonidi allevati (trote iridea) che selvatici (trote iridea e trote fario) nei bacini idrografici dell'Adige (provincia di Bolzano), del Sarca (provincia di Trento) e del Brenta (provincia di Venezia). La prevalenza osservata nei diversi bacini idrografici variava dall'86,6% nel Sarca, al 56,5% nel Brenta e al 40% nell'Adige. Attualmente pertanto l'areale conosciuto di questo parassita è situato nel Trentino Alto Adige (in entrambe le provincie autonome) e nella parte settentrionale della provincia di Venezia e la parassitosi interessa sia pesci allevati che materiale ittico selvatico. Nel luglio 2017, durante campionamenti finalizzati alla caratterizzazione dello stato sanitario di allevamenti di trota iridea in nord Italia, presso un allevamento posto nel bacino del Ticino, è stata rilevata la presenza di parassiti presenti nella vescica natatoria, identificati a livello morfologico come *C. farionis*. Tutte le trote iridea campionate sono stati misurate, pesate e sottoposte ad esame anatomopatologico e parassitologico esterno ed interno. Sono stati campionati 50 soggetti di due lotti differenti, provenienti dal medesimo allevamento dove si è riscontrata una positività molto alta: infatti 31 esemplari sono risultati positivi, con una prevalenza del 62%. Al riscontro parassitologico è seguita una verifica diretta con l'allevatore, per cercare di stabilire l'autoctonia del caso o la possibile diversa provenienza delle trote infestate. Le risultanze sono state inequivocabili, con una certezza della provenienza del lotto di pesci dal bacino del Sarca in Trentino. Valutato il grado di infestazione riscontrato e quindi la possibilità reale di avere portato a compimento il ciclo biologico del parassita nell'ambiente idrico attorno all'impianto, si è cercato di effettuare celermente un monitoraggio sui gammaridi quali possibili ospiti intermedi della parassitosi. Sono stati campionati due settimane dopo il ritrovamento 322 anfipodi, prelevati sia a monte che a valle delle vasche in cui erano presenti i pesci parassitati, per cercare di valutare la presenza o meno di larve negli ospiti intermedi. Tutti gli esemplari sono risultati negativi, ma la scarsa numerosità campionaria analizzata e la bassa prevalenza del parassita nella popolazione degli ospiti intermedi risultata in studi precedenti (1,88%), porta ad indicare che tale negatività possa non essere reale. Questa parassitosi sicuramente non riveste un'importanza in sanità pubblica, ma non va sottovalutata per le implicazioni funzionali che causa, tali da portare a modificazioni fisiche e fisiologiche, con possibile compromissione delle performance zootecniche e del valore commerciale. Inoltre l'eventuale rischio che il ciclo biologico possa perpetrarsi nel nuovo ambiente, porta alla possibilità di introduzione di un parassita da considerarsi esotico per questo ecosistema, dove la presenza di fattori biotici e abiotici favorevoli possono permettere una colonizzazione stabile nelle future popolazioni ittiche allevate e selvatiche. Il pericolo che si può incorrere in operazioni non oculate di traslocazione faunistica è evidente in questo caso particolare che appare emblematico sul possibile rischio di introduzioni di patogeni alieni in nuovi territori.



**RUOLO DI *CYSTICOLOIDES EPHEMERIDARUM* (NEMATODA: CYSTICOLIDAE) NELL'ETIOPATOGENESI DI DEFORMITÀ SCHELETRICHE DOCUMENTATE IN TROTE FARIO (*SALMO TRUTTA FARIO*) PROVENIENTI DAL PARCO NAZIONALE DELL'ASPROMONTE**

Scopelliti F.<sup>1</sup>, De Benedetto G.<sup>2</sup>, Gaglio G.<sup>2</sup>, Belvedere A.<sup>3</sup>, Belmusto G.<sup>3</sup>, Trombetta D.<sup>1</sup>, Siclari A.<sup>4</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; <sup>3</sup> Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Calabria; <sup>4</sup> Ente Parco Nazionale dell'Aspromonte

Lo studio è stato condotto su 18 esemplari di trota fario (*Salmo trutta fario*), prelevati, previa convenzione con l'Ente Parco Nazionale dell'Aspromonte, da diversi corsi d'acqua confluenti nella provincia di Reggio Calabria. L'obiettivo è stato quello di approfondire le conoscenze acquisite in precedenza ed evidenziare il ruolo del nematode appartenente alla specie *Cysticoloides ephemeridarum* nell'eziopatogenesi di deformità scheletriche, che da un ventennio venivano segnalate nella quasi totalità dei soggetti catturati in prossimità di una ex base della United States Air Force (U.S.A.F.), nel cuore dell'Aspromonte. Le analisi sono state effettuate presso la Sezione di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Messina e dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Calabria (A.r.p.a.Cal.). Il parassita possiede un corpo di colore biancastro, lunghezza massima di 8 mm e larghezza 0,2 mm circa nei maschi, le femmine gravide risultano avere dimensioni fino al doppio dei maschi (lunghezza ca. 14 mm e larghezza ca. 0,3 mm); l'ospite intermedio è un insetto appartenente alla specie *Ephemera* sp., il quale ingerisce le uova contenenti la larva, che, nell'apparato digerente, muta fino ad arrivare allo stadio infestante; la trasformazione in adulto avviene conseguentemente all'ingestione di un soggetto infestato da parte di un Salmonidae, ospite definitivo. All'esame autoptico, macroscopicamente, la quasi totalità degli esemplari, presentava deformità di tipo assiale a carico della colonna vertebrale (cifosi, scoliosi, lordosi), confermate istologicamente; non si evidenziava presenza di spore riferibili a *Myxobolus* spp., né ulteriori lesioni a carico dei restanti organi e tessuti; a livello gastroenterico si è potuta documentare, in 17 soggetti su 18, la presenza, in alcuni casi massiva, del nematode oggetto di studio; alcuni esemplari, tutti provenienti dallo stesso sito di campionamento, evidenziavano una carica parassitaria significativamente inferiore, non presentando alcuna anomalia scheletrica. Contestualmente sono state eseguite ulteriori analisi per la ricerca di radioattività e metalli pesanti sia su muscolo e organi di *S. trutta fario* che su altri bio indicatori (muschi, licheni, sedimenti fluviali, acque superficiali); le indagini hanno dato esito negativo, fornendo risultati in alcuni casi inferiori ai limiti minimi rilevabili, unica eccezione è stata la presenza di <sup>137</sup>Cs, rilevato in tracce nel sedimento fluviale ed imputabile al fall-out radioattivo di Chernobyl. In base ai dati statistici ricavati dall'esame parassitologico, possiamo affermare che le deformità riscontrate possono essere collegate all'imponente infestazione parassitaria nei soggetti patologici, con conseguente deplezione vitaminica (C e D) e alterazione nel metabolismo del calcio, elemento essenziale nei processi di ossificazione e sviluppo della colonna vertebrale, come riportato per i vertebrati superiori. I dati ottenuti dalle indagini tossicologiche forniscono informazioni utili sul rischio ambientale dell'area studiata e possono essere ulteriormente analizzati e ripetuti nel tempo per poter formulare una mappatura sulla radioattività e la presenza di inquinanti ambientali, pur non risultando alcuna correlazione con la patologia oggetto del presente studio.

# **TRIENOFOROSI IN LUCCI (*ESOX LUCIUS*) E PLEROCERCOSI DA *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* IN PESCI PERSICO (*PERCA FLUVIATILIS*) PROVENIENTI DAL MARE DEL NORD**

Corti I.<sup>1</sup>, Colafranceschi I.<sup>2</sup>, Gaglio G.<sup>3</sup>, Malandra R.<sup>4</sup>, Costa A.<sup>5</sup>, Marino F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consulente Veterinario, Milano (MI); <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali Università di Messina, Messina; <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie Università di Messina; <sup>4</sup> Veterinario responsabile S.S. Mercati Generali, ATS Città Metropolitana di Milano, Milano; <sup>5</sup> Porrazzito S.r.l., Acate (RG).

I parassiti dei prodotti ittici possono determinare degli impatti sulla Sanità Pubblica (zoonosi parassitarie), ma anche avere degli effetti sulla qualità dei prodotti destinati alla commercializzazione.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di effettuare uno studio parassitologico e istopatologico rispettivamente in esemplari di pesce persico (*Perca fluviatilis*) e di luccio (*Esox lucius*), importati dall'area di pesca dell'Atlantico Nord- Orientale - Mare del Nord Settentrionale (zona FAO 27 IV a) e commercializzati al mercato ittico di Milano.

Dodici esemplari di pesce persico e ventisette di luccio sono stati sottoposti ad esame necroscopico, parassitologico e istopatologico. Un esame visivo è stato effettuato per valutare l'integrità dell'aspetto esterno. Su ciascun esemplare è stato condotto un esame macroscopico e allo stereomicroscopio sui visceri per evidenziare eventuali lesioni e presenza di parassiti. I pesci persico sono stati sottoposti a sfilettatura e speratura. Gli Eventuali organi parassitati sono stati fissati in formalina per le successive indagini istologiche.

Quattro dei 12 (P= 33,3%) pesci persico presentavano 1-2 formazioni cistiche nel parenchima epatico. Lo studio morfologico ha permesso di classificarle come forme larvali di *Triaenophorus nodulosus*. La speratura non ha evidenziato presenza di forme parassitarie. Sei dei 27 (P=22,2) lucci sono risultati positivi alla presenza di cestodi in numero variabile da 2 a 4 per ospite. In totale sono stati isolati 20 cestodi di lunghezza variabile da 8 a 24 cm di lunghezza. L'esame parassitologico si è basato sulle caratteristiche morfometriche dello scolice e degli uncini, consentendo l'attribuzione dei parassiti alla specie *T. nodulosus*.

L'esame istopatologico sui campioni di fegato di pesce persico ha evidenziato la presenza di cisti contenenti i plerocerci. Le lesioni riscontrate sono di tipo granulomatoso. La parete delle formazioni cistiche epatiche appariva caratterizzata da un sottile vallo di cellule macrofagiche ed epitelioidi circondato esternamente da una capsula fibrosa costituita da strati di fibroblasti.

La presenza di forme larvali e adulte di *T. nodulosus* confermano la diffusione del parassita nell'area di studio. Queste parassitosi non rappresentano, fortunatamente, un problema di Sanità Pubblica in quanto non zoonotiche. La presenza di questi parassiti, nonostante la loro localizzazione tipica (prevalentemente cavità celomatica), va comunque considerata in virtù della normativa in vigore, la quale prevede che l'operatore del settore alimentare deve assicurare l'assenza di parassiti visibili.

## OLTRE LA BARRIERA TEMPO: RICERCA SULLE INFESTAZIONI DA TREMATODI DIGENEI IN BIVALVI DI ACQUA SALMASTRA DELL'OLOCENE ITALIANO

Azzarone M.<sup>1</sup>, Scarponi D.<sup>1</sup>, Scirocco T.<sup>2</sup>, Caffara M.<sup>3</sup>, Gustinelli A.<sup>3</sup>, Fioravanti M.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna, via Selmi 3, Bologna;

<sup>2</sup> Istituto di Scienze Marine – Consiglio Nazionale delle Ricerche, via Pola, 4 - Lesina (FG); <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, via Tolara di Sopra 50, Ozzano Emilia (BO)

Le previsioni di un incremento delle temperature globali e di un conseguente innalzamento del livello del mare nei prossimi decenni/secoli ha sollevato interrogativi riguardo la risposta dei parassiti al cambiamento climatico antropogenico. In particolare questo lavoro prevede lo studio delle tracce di parassitismo da trematodi digenei Gymnophallidae che si manifestano in forma di *pits*, depressioni ovali con bordi rialzati all'interno delle valve di esemplari fossili di *Abra segmentum*, per verificare se questo tipo di lesione sia presente (e con quale frequenza) anche negli esemplari attuali comparandole con quelle evidenziabili in *A. segmentum* datati fino a circa 9000 anni fa. Gli esemplari viventi di *A. segmentum* studiati in questa ricerca sono stati campionati in tre aree salmastre costiere, Piallassa Baiona (RA), Saline di Cervia (FC) e Laguna di Lesina (FG). Le località scelte rappresentano habitat ideali per la specie *A. segmentum*, nonché analoghi moderni degli ambienti olocenici in studio. Per ogni sito sono state delimitate aree di 25 m<sup>2</sup> e, per i siti romagnoli, raccolti ~200 esemplari vivi di *A. segmentum* durante Giugno - Luglio 2017, mentre nella Laguna di Lesina oltre ai campionamenti estivi consistenti in ~200 esemplari vivi, erano stati prelevati ulteriori ~100 esemplari anche durante Novembre - Dicembre 2016. I bivalvi sono stati aperti ed esaminati allo stereomicroscopio; il tessuto molle è stato rimosso dalle valve e pressato tra due vetrini portaoggetto per l'individuazione di sporocisti, cercarie e metacercarie di trematodi digenei, con particolare attenzione a queste ultime che sono ritenute responsabili della formazione dei *pits* sulle valve interne (Campbell, 1985, Cremonte & Ituarte, 2003). Gli elementi parassitari riscontrati venivano fissati in etanolo 70%, sia previo isolamento sia all'interno dei tessuti, per la successiva identificazione morfologica e molecolare. I risultati indicano valori di prevalenza di stadi larvali di trematodi digenei molto variabili e talvolta molto elevati nella Laguna di Lesina (tra 6 e 61%), e valori di prevalenza inferiori e con range meno ampio in quelli delle Saline di Cervia (tra 23 e 34%) e Piallassa Baiona (tra 7 e 17%). Quando riferiti agli esemplari con sole metacercarie la prevalenza media nella laguna di Lesina scende al 21%±5%, 20%±5% per le Saline di Cervia e 7%±3% per Piallassa Baiona. A livello stagionale, nella Laguna di Lesina i campioni invernali hanno presentato prevalenza inferiore rispetto a quelli estivi, con valore massimo di 6%. L'analisi dei *pits* sulle valve degli esemplari attuali parassitati ha messo in luce come gli esemplari di *A. segmentum* viventi sviluppino accenni di *pits* molto meno marcati rispetto alle controparti fossili, sebbene sia da evidenziare come l'identificazione dei parassiti reperiti nel corso della presente indagine sia ancora in corso. Il confronto preliminare tra i valori di prevalenza dei *pits* in *A. segmentum* fossili riportati da Scarponi *et al.* (2017) evidenzia come mediamente la presenza dei *pits* nel record fossile durante le fasi di rapido innalzamento del livello marino appaia più elevata rispetto agli esemplari attuali.

I risultati ottenuti nel corso di questa indagine nel confronto tra *Abra segmentum* fossili e attuali, pone l'accento sull'importanza di ulteriori approfondimenti sul rischio che l'aumento del livello marino causato dal riscaldamento globale possa in futuro, come già accaduto in passato, provocare una maggior diffusione e patogenicità di parassiti marini con effetti negativi sugli ecosistemi interessati.

Campbell D. (1985). The life cycle of *Gymnophallus rebecqui* (Digenea: Gymnophallidae) and the response of the bivalve *Abra tenuis* to its metacercariae. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 65(3): 589-601.

Cremonte F. & Ituarte C. (2003). Pathologies elicited by the gymnophallid metacercariae of *Bartolius pierrei* in the clam *Darina solenoides*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 83(2): 311-318.

Scarponi D., Azzarone M., Kowalewski M. & Huntley J.W. (2017). Surges in trematode prevalence linked to centennial-scale flooding events in the Adriatic. *Scientific Reports*: 7.

## PRIMA INDAGINE SULLA PRESENZA DI PARASSITI ANISAKIDI IN SPIGOLE ED ORATE D'ALLEVAMENTO COMMERCIALIZZATE E PRODOTTE IN SICILIA

Cammilleri G.<sup>1</sup>, Costa A.<sup>1</sup>, Vella A.<sup>1</sup>, Graci S.<sup>1</sup>, Buscemi M.D.<sup>1</sup>, Collura R.<sup>1</sup>, Ganci F.<sup>2</sup>, Incardona A.<sup>2</sup>, Iannazzo I.<sup>3</sup>, Santangelo F.<sup>4</sup>, Giangrosso G.<sup>1</sup>, Ferrantelli V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Via Gino Marinuzzi 3, 90129, Palermo (PA); <sup>2</sup> ASP 2 Caltanissetta- Servizio I.A.O.A., Via Giacomo Cusmano 1, 93100, Caltanissetta (CL); <sup>3</sup> Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana, Viale della Regione Siciliana Sud Est 2771, 90145 Palermo (PA); <sup>4</sup> ASP 6 Palermo, Dipartimento di Prevenzione Veterinario, Via Onorato 6, 90139 Palermo (PA)

L'Opinione scientifica dell'EFSA del 2010 (Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products), delinea come unica specie esente da rischi sanitari legati ai parassiti Anisakidi il salmone di acquacoltura, qualora allevato in gabbie fluttuanti o gabbie *on-shore* e nutrito da mangimi con assenza di parassiti vivi oppure l'operatore del settore alimentare verifica mediante procedure approvate dall'autorità competente che i prodotti della pesca non rappresentano un rischio sanitario con riguardo alla presenza di parassiti vivi. Tale opinione è stata confermata da diversi studi condotti su allevamenti di salmone in Norvegia (Angot & Brasseur 1993; Lunestad 2003).

L'assenza di parassiti anisakidi in pesci di allevamento è stata riscontrata anche per altre specie ittiche marine come la spigola (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*). Uno studio condotto da Penalver ha verificato la totale assenza di questi parassiti su 871 campioni di spigola ed orata provenienti da allevamenti del sud-est della Spagna. Attualmente non si hanno riscontri scientifici sulla prevalenza d'infestazione di anisakidi nei pesci d'acquacoltura prodotti e commercializzati in Italia. Per tale motivo è stato condotto un piano di campionamento volto a prelevare diversi campioni ittici provenienti da allevamenti siciliani e greci commercializzati in Sicilia, in maniera tale da verificare la presenza e prevalenza d'infestazione di parassiti anisakidi. Sono stati esaminati un totale di 143 campioni di spigola e 110 campioni di orata. Tutti i campioni esaminati erano di taglia commerciale (superiore ai 200 g).

I campioni prelevati e conservati a +4°C sono stati trasferiti presso i laboratori del C.Re.N.A, dove sono state svolte le indagini preliminari d'ispezione visiva di visceri e muscolo. Nei casi di assenza di larve all'ispezione visiva i campioni sono stati sottoposti a digestione cloropeptica. Le eventuali larve riscontrate sono state sottoposte ad identificazione morfologica, tramite microscopia ottica ed ad indagini molecolari basate sulla tecnica di PCR-RFLP. L'indagine ispettiva ha verificato la presenza di 2 parassiti ascrivibili alla famiglia Anisakidae solamente in un solo campione di spigola proveniente da allevamenti siti in Grecia, rivelando una prevalenza d'infestazione in tutti i campioni di spigola esaminati pari a 0,7%. Le larve sono state riscontrate all'interno della cavità celomatica. Nessuna larva è stata riscontrata invece nei campioni di orata esaminati.

Le larve riscontrate nel campione di spigola sono state identificate morfologicamente come appartenenti al morfotipo I del genere *Anisakis*. Le indagini molecolari hanno rivelato l'appartenenza di queste larve alla specie *Anisakis pegreffii*. Il presente studio rappresenta il primo report sulla presenza di parassiti anisakidi in orate e spigole di allevamento. Il ritrovamento di anisakidi in pesci allevati può essere ricondotto alle diverse politiche d'acquacoltura; tuttavia la prevalenza di infestazione in queste realtà produttive si rivela ancora bassissima.

Angot V. & Brasseur P. (1993). European farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are safe from anisakid larvae. *Aquaculture*, 118 (4): 339-344.

Lunestad B.T. (2003). Absence of Nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *J. Food Prot.*, 66(1): 122-124.

## INDAGINE PARASSITOLOGICA SULLA PRESENZA DI STADI LARVALI DI NEMATODI ANISAKIDAE IN PESCI MARINI ALLEVATI IN ITALIA

Menconi V.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>1</sup>, Caffara M.<sup>1</sup>, Francalacci C.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna; <sup>2</sup> Veterinario libero professionista

L'anisakiasi è una zoonosi parassitaria di origine alimentare sostenuta da larve al terzo stadio (L3) di nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae ed in particolare al genere *Anisakis*. Soprattutto in seguito alla recente emergenza di sindromi allergiche da *Anisakis*, l'EFSA nel 2010 ha pubblicato un parere scientifico sui rischi correlati alla presenza di parassiti zoonotici in prodotti ittici, considerando sicura la pratica d'allevamento del salmone atlantico (*Salmo salar*) in quanto, se allevati partendo da avannotti prodotti in sistemi chiusi e alimentati sempre con mangime inerte, questi animali presenterebbero un rischio di infestazione da larve di *Anisakis* trascurabile. Su questa base, il Reg. UE n. 1276/2011, che modifica l'allegato III del Reg. CE n. 853/2004, puntualizza la possibile deroga al trattamento di congelamento, obbligatorio per i prodotti della pesca destinati ad essere consumati sotto forma di preparazioni a rischio (crudi, marinati, affumicati a freddo, ecc.), per i prodotti ittici derivanti da allevamento quando vengono rispettati i criteri definiti dall'EFSA analogamente al salmone atlantico. Appare quindi d'importanza strategica fornire dati scientifici estesi ed attendibili sull'assenza di parassiti zoonotici nei prodotti della maricoltura mediterranea non solo ai fini di una loro migliore qualificazione commerciale ma anche per una più facile applicabilità di tale deroga da parte delle autorità competenti. Nell'ambito delle attività di ricerca previste dal progetto europeo H2020 ParaFishControl "Advanced Tools and Research Strategies for Parasite Control in European farmed fish", da marzo 2016 a giugno 2017 è stato condotto un esteso monitoraggio parassitologico in spigole (*Dicentrarchus labrax*) ed orate (*Sparus aurata*) allevate in Italia. Le attività di campionamento hanno coinvolto 4 allevamenti nazionali, di cui 3 in gabbie galleggianti ed uno in vasche a terra, prelevando almeno 258 esemplari per specie/allevamento suddivisi in 4 campionamenti a cadenza stagionale per un totale di 1040 spigole e 1090 orate. La numerosità campionaria è stata calcolata in modo da ottenere almeno il 95% di probabilità di evidenziare un esemplare positivo con prevalenza >2%. Per la ricerca di larve di nematodi Anisakidae sono stati associati: esame visivo diretto e mediante transilluminatore di visceri e porzioni muscolari, metodo della UV-press dei filetti e digestione con soluzione cloro-peptica del pacchetto viscerale. Tutti gli esemplari di spigola e orata esaminati sono risultati negativi per la presenza di stadi larvali di *Anisakis* spp. In un unico esemplare di spigola proveniente da un allevamento in gabbia è stata evidenziata la presenza di una larva di *Hysterothylacium fabri* (nematode non zoonotico) incistata sulla superficie del fegato ed identificata a livello di specie mediante PCR-RFLP. Alla luce della trasmissione di questo parassita a pesci predatori per via trofica, similmente ai nematodi Anisakidae zoonotici, nel prossimo futuro verranno condotte indagini mirate ad identificare i fattori di rischio che hanno condotto all'infestazione da *H. fabri* in allevamento, seppur in un unico esemplare, ed individuare gli eventuali punti critici da monitorare. I risultati ottenuti da questa indagine indicano comunque come nelle spigole e nelle orate allevate in Italia il rischio d'infestazione da *Anisakis* sia da ritenersi trascurabile, aprendo la via ad azioni di qualificazione dei prodotti della maricoltura mediterranea.

*The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.*

## PRIMA SEGNALEZIONE DI UN PAPILOMA LABIALE IN UN CICLIDE MBUNA DEL LAGO MALAWI

Antuofermo E.<sup>1</sup>, Polinas M.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>, Santi M.<sup>2</sup>, Piga S.<sup>3</sup>, Prearo M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari (SS); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO); <sup>3</sup> Bioparco Zoom Torino, Cumiana (TO).

Tra le neoplasie segnalate nelle specie ittiche, quelle di origine epiteliale e in particolare le forme benigne come i papillomi, sono quelle maggiormente rappresentate. Queste neoplasie riconoscono numerosi fattori eziologici che ne determinano l'insorgenza, tra i quali agenti virali, agenti chimici, inquinamento, traumatismi cronici e fattori di origine sconosciuta. I papillomi sono stati descritti in diverse specie ittiche e, nonostante si riconoscano numerose caratteristiche comuni, presentano alcune differenze nella presentazione clinica e nei quadri istologici.

Il presente caso descrive le caratteristiche istopatologiche di un papilloma localizzato nella porzione sinistra del labbro inferiore di un esemplare adulto di ciclode mbuna del lago Malawi, *Pseudotropheus demasoni*, stabulato in una vasca espositiva. L'esemplare è giunto casualmente in laboratorio in quanto facente parte di un pool di pesci destinati ad un monitoraggio sanitario. Il soggetto giunto in laboratorio con un pool di altri ciclidi, dapprima è stato stabulato in un acquario dove è apparsa evidente l'escrescenza labiale. Il soggetto è stato quindi prelevato, anestetizzato mediante sedazione profonda con MS-222 e portato al tavolo necroscopico. La neoplasia si presentava a crescita esofitica con ampia base di impianto, di colore biancastro aspetto cupoliforme liscio di consistenza soda e parzialmente ulcerata. La neoformazione, una volta escissa, è stata fissata in formalina tamponata al 10%, sottoposta ad esame istologico e colorata con Ematossilina-Eosina. L'esame immunoistochimico è stato eseguito utilizzando l'anticorpo anti-citocheratina AE1-AE3. I risultati istopatologici hanno mostrato la proliferazione delle cellule malpighiane e basali riunite a formare papille e strutture simil-lobulari e separate da abbondante connettivo collagene. Le cellule malpighiane presentavano moderato citoplasma eosinofilo, nucleo rotondo con cromatina granulare ed un nucleolo raramente evidente. All'interno degli aggregati di maggiori dimensioni si apprezzava la presenza di aree di sfaldamento epiteliale frammiste a macrofagi e detriti cellulari. L'infiltrato infiammatorio intraepiteliale era caratterizzato da scarsi linfociti. L'esame immunoistochimico ha confermato l'origine epiteliale della neoplasia, evidenziando un'intensa e diffusa positività delle cellule epiteliali alle citocheratine.

Questo lavoro rappresenta la prima descrizione di un papilloma in un ciclode mbuna a localizzazione labiale. Ulteriori indagini di biologia molecolare sono in corso per valutare una possibile eziologia virale della neoplasia.

## PAPILLOMA IN UN ABRAMIDE (*ABRAMIS BRAMA*, L. 1758) SELVATICO PROVENIENTE DAL DELTA DEL PO

De Benedetto G.<sup>1</sup>, Capparucci F.<sup>2</sup>, Corti I.<sup>3</sup>, Iaria C.<sup>2</sup>, Malandra R.<sup>4</sup>, Marino F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; <sup>3</sup> Consulente Veterinario, Milano; <sup>4</sup> Veterinario responsabile S.S. Mercati Generali, ATS Città Metropolitana di Milano

I tumori benigni di origine epiteliale sono stati frequentemente riportati in varie specie ittiche, quali *Mustelus canis*, *Salmo salar*, *Anguilla anguilla*, tra gli altri; solitamente riconoscono un'eziopatogenesi virale, e in alcuni casi imputabile ad agenti chimici o traumi meccanici. Presso il mercato ittico di Milano, è stato rinvenuto un soggetto appartenente alla specie *Abramis brama*, catturato presso il Delta del fiume Po, il quale presentava una massa nodulare di circa 2 cm, iperemica, con margini irregolari, di consistenza dura, localizzata nel terzo medio inferiore destro della pinna caudale. Il tessuto neoformato, dopo l'esame autoptico che non ha evidenziato ulteriori lesioni, è stato asportato, fissato in formalina tamponata al 10% ed inviato alla Sezione di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Messina per effettuare le consuete indagini istopatologiche. Una sezione trasversale della massa è stata processata secondo le routinarie colorazioni istologiche (Ematossilina/Eosina), istochimiche (Tricromica di Masson ed Alcian Blu PAS) ed immunoistochimiche (Citocheratina clone AE1/ AE3). Le analisi effettuate hanno evidenziato la natura epiteliale della massa. All'esame istologico, il tessuto neoformato sembrava emergere dallo strato epiteliale della coda accrescendosi verso l'esterno, deformando l'intera porzione interessata dalla lesione. Il tessuto neoplastico appariva caratterizzato da cellule poligonali di aspetto lobulare, strettamente addensate tra loro, circondato da un sottile stroma connettivale, scarsamente vascolarizzato. La colorazione PAS ha evidenziato la presenza di poche cellule mucipare caliciformi, le quali apparivano irregolarmente distribuite nella porzione più profonda della massa. La valutazione immunoistochimica ha mostrato una forte reattività citoplasmatica e peri-nucleare delle cellule epiteliali alla pan-citocheratina. A conferma della natura benigna della neoplasia è stato riscontrato un basso indice di proliferazione cellulare con l'uso di Ki-67. Basandoci sui risultati ottenuti attraverso le indagini istologiche ed immunoistochimiche, possiamo identificare il tumore come papilloma cutaneo. Sebbene l'agente virale associato alla papillomatosi della specie in esame non sia ancora stato identificato, questa patologia potrebbe essere correlata anche a condizioni ambientali avverse, come conseguenza di tossine oncogeniche algali o inquinanti ambientali.

**INDAGINE ISTOPATOLOGICA ED EZIOLOGICA SU LESIONI PAPILLOMATOSE RILEVATE IN UNA POPOLAZIONE SELVATICA DI BARBO ITALICO (*BARBUS PLEBEJUS* BONAPARTE, 1839) E BARBO EUROPEO (*BARBUS BARBUS* LINNAEUS, 1758) NEL FIUME ADDA**

Salogni C.<sup>1</sup>, Gibelli L.R.<sup>1</sup>, Pigoli C.<sup>1</sup>, Lavazza A.<sup>1</sup>, Prosperi A.<sup>1</sup>, Villa R.<sup>1</sup>, Ruggeri J.<sup>1</sup>, Alborali G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna

Le lesioni proliferative cutanee a carattere neoplastico sono descritte con una certa frequenza nei pesci ed osservate sia in soggetti selvatici che allevati, sia in acque dolci che salate. Esse sono anche denominate “Idiopathic Epidermal Proliferation (IEP)” in merito alla loro poco chiara eziologia. Tra le IEP troviamo le lesioni iperplastiche e papillomatose, descritte in numerosi ciprinidi tra cui il barbo europeo. La loro eziologia è stata di volta in volta riferita all’azione di agenti infettivi virali (herpesvirus, adenovirus, retrovirus ecc.) o ad altri fattori quali l’inquinamento o i traumatismi; in tutti casi risulta tuttavia difficile associare univocamente la patologia ad un preciso agente eziologico. L’incidenza delle lesioni, nei casi dove è stata indicata, ha subito un sensibile incremento quando una popolazione ittica è stata sottoposta a eventi particolarmente stressanti. Lo scopo di questo lavoro è quello di indagare su lesioni proliferative cutanee “papilloma-like” rilevate in una popolazione naturale di barbo nel fiume Adda. Quest’ultima è stata individuata da pescatori sportivi che frequentano assiduamente tale Fiume tra i comuni di Olginate e Brivio (LC), a valle del Lago di Lecco e a monte della diga di Robbiate. I primi pesci affetti sono stati catturati tramite amo e lenza a partire dal mese di Gennaio del 2016. Successivamente si è assistito ad un progressivo incremento di incidenza, sebbene con fasi alterne, tale da far sospettare una possibile contagiosità. E’ tuttavia impossibile quantificare con precisione l’entità dei soggetti colpiti, non essendo mai stati effettuati campionamenti mirati a tale scopo (es.: reti, elettropesca). Fluttuazioni sono state osservate durante l’anno, probabilmente connesse alla migrazione dei pesci per motivi riproduttivi o alimentari. Nel tratto di Adda segnalato sono presenti numerose specie di pesci tra cui ciprinidi come il barbo: l’autoctono barbo italiano (*B. plebejus*), il barbo europeo (*B. barbus*) e probabilmente i loro ibridi. Nessun altra specie oltre al barbo è stata segnalata come interessata dal problema. Nel mese di marzo del 2017 tre barbi sono stati campionati e sottoposti ad esame necroscopico, esame istologico, esame parassitologico a fresco da cute, branchie ed intestino; esame batteriologico culturale su terreni agarizzati (agar sangue e TSA) da cervello, fegato, rene, milza e cute; esame virologico da cute e pool di visceri (rene, milza, cervello e cuore) tramite infezione di linee cellulari (EPC and BF2), esame al microscopio elettronico a trasmissione (colorazione negativa a goccia), ELISA (attività retrotrascrittasi) e diagnostica molecolare (PCR per papillomavirus). L’esame necroscopico ha evidenziato lesioni proliferative cutanee con superficie irregolare, digitiforme e a volte mammellonata, localizzate prevalentemente lungo i fianchi o alle pinne. Le dimensioni erano variabili da 5 a 70 mm. L’esame parassitologico ha evidenziato la presenza di *Piscicola geometra* da cute. L’esame istologico, eseguito con colorazione ematossilina-eosina, ha evidenziato delle lesioni cutanee papillomatose, caratterizzate da iperplasia delle cellule epidermiche con proiezioni digitiformi multiple supportate da connettivo fibrovascolare; al centro delle lesioni papillomatose erano presenti delle cellule mucose. Gli esami batteriologici e virologici hanno dato esito negativo. Sebbene siano stati eseguiti numerosi esami l’eziologia della malattia rimane tuttora ignota. Sono stati tuttavia individuati alcuni fattori ambientali che possono avere agito da importanti stressogeni sulla popolazione ittica affetta, tra i quali si segnala il basso livello idrico e la presenza di una intensa attività predatoria esercitata dall’avifauna.



## ASPETTI ANATOMOISTOPATOLOGICI INUSUALI DI UN FIBROMA IN MORMORA (*LITHOGNATHUS MORMYRUS* L. 1758) SELVATICA

Iaria C.<sup>1</sup>, Puleio R.<sup>2</sup>, La Cavera E.<sup>2</sup>, Fiasconaro M.<sup>2</sup>, Valerioti S.<sup>3</sup>, Bonasoro I.<sup>4</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Palermo (PA); <sup>3</sup> ASP 5 Taormina, (ME); <sup>4</sup> Libero professionista

Il presente lavoro segnala gli aspetti anatomoistopatologici inusuali riscontrati in un fibroma di un teleosteo selvatico. Un adulto di mormora (*Lithognathus mormyrus* L. 1758) pescato nelle acque costiere di fronte a Taormina (ME) è stato inviato all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Il pesce mostrava una neoformazione multicentrica, con evidenti processi di ulcerazione, sul lato destro del corpo. E' stato effettuato un esame macroscopico e tecniche di istopatologia e immunoistochimica sono state eseguite sul tessuto tumorale ai fini dell'identificazione dell'origine cellulare. Tutti i tessuti neoplastici sono stati sezionati trasversalmente e fissati in soluzione di formalina tamponata al 10% ai fini della processazione routinaria per istologia e immunoistochimica. Sono stati utilizzati anticorpi policlonali di coniglio per S-100, actina e vimentina. Per testare la specificità dell'immunocolorazione al fine di escludere la possibilità di una reazione non specifica, sezioni di tessuto positive note e controlli negativi privi di anticorpi primari venivano utilizzati come controlli. Il tumore presentava una forma irregolarmente tondeggiante, con aspetto a grappolo, e misurava 3x2 cm. La superficie appariva liscia e di colore bianco-grigiastro, a tratti ulcerata, con emorragie diffuse. La massa si estendeva sul lato destro deformando il fianco del pesce. Un'altra neoformazione era presente nelle vicinanze, sebbene separata dalla principale; questa risultava più vicina alla regione laterale cranica; essa misurava 1x1 cm e aveva forma tondeggiante, di colore biancastro, con emorragie. Istologicamente, il tessuto neoformato era caratterizzato da cellule monomorfe fusiformi, disposte in maniera irregolare, con citoplasma basofilo ben definito. Talora queste cellule erano disposte in fasci paralleli od orientate in gruppi a spirale. Tutta la massa appariva confinata, capsulata e non invasiva. La vascolarizzazione era scarsa. I nuclei erano vescicolari e qualche volta ipercromatici, allungati e paralleli all'asse maggiore della cellula. Le mitosi non erano frequenti e, comunque, mai atipiche. L'immunoistochimica mostrava immunoreattività citoplasmatica per vimentina e actina, mentre risultava negativa per S-100. Sulla base delle nostre analisi è stata formulata una diagnosi di fibroma dermico. Il fibroma è stato già riportato nei pesci, ma mai in questa specie, in cui di contro risultano frequentemente riportati lipomi, fibrolipomi e liposarcomi. Si potrebbe individuare la causa di questa formazione tumorale in diversi agenti, come corpi estranei, agenti virali, tossici e non ultimi parassiti.

## **LESIONI NODULARI PIGMENTATE IN ANELLI DI TOTANO GIGANTE DEL PACIFICO (*DOSIDICUS GIGAS*): L'ASPETTO MORFOLOGICO INGANNA**

Corti I.<sup>1</sup>, Banco B.<sup>2</sup>, Tecilla M.<sup>2</sup>, Ghisleni G.<sup>3</sup>, Malosio M.<sup>3</sup>, Ranghieri V.<sup>3</sup>, Malandra R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Libero professionista, Milano, (MI); <sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Milano (MI); <sup>3</sup> Libero professionista, Mercato Ittico, Milano, (MI); <sup>4</sup> Veterinario responsabile S.S. Mercati Generali, ATS Città Metropolitana di Milano, (MI).

Le infestazioni parassitarie legate al consumo umano di prodotti ittici rappresentano un problema di salute pubblica. La tutela del consumatore in campo alimentare è responsabilità dell'Operatore del Settore Alimentare (OSA), il quale deve garantire l'assenza di parassiti macroscopicamente visibili in un campione statisticamente significativo di alimenti. Un lotto di anelli di totano gigante del Pacifico (*Dosidicus gigas*), decongelati, lavorati e conservati in salamoia, è pervenuta al Mercato Ittico all'ingrosso di Milano. All'esame macroscopico, gli anelli presentavano numerosi noduli ovoidali, delle dimensioni massime di 2-3 mm x 5 mm x 2-3 mm, giallastri, localizzati nella porzione muscolare del mantello. In nessun caso erano evidenti alterazioni della consistenza e dei caratteri organolettici. Sulla base dell'aspetto macroscopico, la lesione è stata ipotizzata essere di natura parassitaria (probabilmente protozoaria) e il prodotto è stato ritirato dal commercio.

Le porzioni di mantello interessate sono state fissate in formalina e sottoposte ad esame istologico. Istologicamente, i noduli erano costituiti da fotofori immersi nella muscolatura del mantello. I fotofori sono organi bioluminescenti, con funzione sia mimetica sia di riconoscimento e segnalazione intraspecifici. I fotofori sono difficilmente identificabili nei totani freschi per via della loro fisiologica colorazione chiara; inoltre, densità e dimensioni variano a seconda della regione anatomica. I processi di congelamento e refrigerazione sembrerebbero coinvolti nella maggiore evidenziazione macroscopica di questi organi, che assumono colorazione più intensamente giallastra. Sebbene si tratti di strutture fisiologiche/anatomiche, la presenza di un pattern cromatico e lesionale confondibile con una parassitosi obbliga l'OSA al ritiro del prodotto dal commercio. In conclusione, anche in presenza di false lesioni parassitarie, il giudizio ispettivo da formulare non cambia e i conseguenti provvedimenti sono identici a quelli applicati per i parassiti. Tuttavia, la precisa identificazione della lesione dal punto di vista ispettivo veterinario continua ad avere un ruolo fondamentale nella tutela del consumatore e nell'indagine epidemiologica delle lesioni riscontrabili nelle specie ittiche.

## CASO DI FUSIONE DEGLI EMIPENI IN SQUALO MANZO (*HEPTRANCHIAS PERLO*)

Capparucci F.<sup>1</sup>, De Benedetto G.<sup>2</sup>, Iaria C.<sup>1</sup>, Saitta M.<sup>1</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina;

<sup>2</sup> Dipartimento Di Scienze Veterinarie, Università Degli Studi Di Messina.

Lo squalo manzo *Heptranchias perlo* appartiene all'ordine degli Hexanchiformi ed è l'unica specie del genere *Heptranchias*. Caratteristica unica di questa specie è la presenza di sette paia di fessure branchiali, l'assenza della prima pinna dorsale e la mancanza della membrana nittitante. In *H. perlo*, la porzione caudale della pinna pelvica si estende a formare le guaine degli emipeni in modo tale da avvolgerli e proteggerli. A differenza di altri squali, lo squalo manzo presenta una struttura detta clasper sac formata da sacche dermiche localizzate nella porzione ventrale di ogni emipene e collegate a muscoli striati. Durante l'accoppiamento, il maschio, contraendo i muscoli delle pinne pelviche provoca il passaggio del liquido seminale nella cavità dell'emipene, ripiena di acqua di mare, e successivamente inoculati all'interno degli ovidotti della femmina. Lo scopo del presente studio è stato quello di descrivere il primo caso di fusione degli emipeni in selacei e individuare la natura patologica del tessuto esuberante documentato a carico degli emipeni di uno squalo manzo. Lo squalo è stato catturato accidentalmente durante una battuta di pesca sportiva nelle acque del Tirreno meridionale antistante il Golfo di Patti e trasportato privo di vita presso il Dip. di Scienze Veterinarie di Messina ed identificato successivamente attraverso le chiavi dicotomiche. Il soggetto, all'esame necroscopico, presentava un evidente iperemia a carico dell'apparato genitale esterno con presenza di tessuto esuberante che univa medialmente i due emipeni nella porzione più distale. Gli emipeni presentavano una lunghezza pari a 8 cm, che, rapportata alla lunghezza totale (LT) del soggetto pari a 98 cm e peso di 3 kg, confermava lo stadio adulto e la maturità sessuale. La neoformazione appariva di aspetto lardaceo, consistenza molle e colore biancastro, l'estensione del tessuto era tale da impedire il movimento indipendente degli emipeni e tale da occludere la parte terminale dei dotti spermatici e del rhipidion, uncino utilizzato per agganciare la femmina durante l'accoppiamento. L'organo è stato asportato e fissato in formaldeide tamponata al 4% per le successive indagini istopatologiche. All'esame istologico effettuato (E/E) si documentava la presenza di tessuto cartilagineo circondato da fibre di tessuto muscolare striato, i quali non hanno evidenziato alterazioni istopatologiche. Adesa a questi ultimi, si riscontrava una vasta porzione di tessuto connettivo lasso, con neovascolarizzazione, con presenza di numerosi fibroblasti immersi in una matrice extracellulare lassa, associata a deposizione di fibre collagene e porzioni di tessuto muscolare multifocali. In alcuni distretti del tessuto neoformato, si documentava un'apparente inversione degli strati tissutali con strutture epiteliali più profonde e tessuto connettivo periferico. Per meglio caratterizzare la natura della lesione è stata eseguita la Tricromica di Masson, portandoci a ipotizzare un'identificazione della lesione come tessuto di granulazione caratterizzato da neoangiogenesi e deposizione di tessuto connettivo associabile a un processo di rigenerazione. Data l'assenza di evidenti patogeni, la formazione del tessuto neoformato localizzato nella porzione terminale degli emipeni è stata probabilmente causata inizialmente da una lesione meccanica traumatica profonda e grave, come confermato dalla presenza di fibre muscolari sparse nel tessuto neoformato, che in seguito sono state esacerbate in modo continuo dalla raschiatura degli emipeni sul fondo del mare promuovendo la cronicità della lesione. Come suggerito anche dall'iperemia diffusa del tessuto più vicino alla massa, il continuo raschiamento degli emipeni non consentiva una rapida risoluzione del processo rigenerativo che portava ad una reazione tissutale esuberante. Inoltre, ulteriori ipotesi eziopatogenetiche potrebbero considerare l'eventualità di una lesione congenita, giustificata dalla presenza di tessuto mixoide rimasto immaturo e indifferenziato, circondante le strutture cartilaginee degli emipeni, o una lesione simil-neoplastica anch'essa congenita assimilabile al papilloma invertito descritto nel cane e nell'uomo.

## REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI IN SCAZZONI (*COTTUS GOBIO*) PRELEVATI IN AMBIENTE LACUSTRE ALPINO

Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Varello K.<sup>1</sup>, Bertoli M.<sup>2</sup>, Francese D.R.<sup>1</sup>, Abbamonte G.<sup>1</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Pizzul E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

Lo scazzone (*Cottus gobio*) è l'unico cottide presente nelle acque interne italiane; originario dell'area padana, è una specie bentonica molto esigente riguardo alla qualità ambientale. Proprio per questa sua sensibilità alle alterazioni fisico-chimiche dei corsi d'acqua è considerato un ottimo indicatore biologico. Pochi dati riguardanti la patologia di questa specie selvatica sono disponibili in letteratura, per lo più legati ad alterazioni patologiche indotte da intossicazioni sperimentali o a segnalazioni su singoli soggetti. Scopo di questo lavoro è di descrivere gli aspetti anatomo-istopatologici riscontrati in scazzoni prelevati nel Lago Dimon, situato nel comune di Ligosullo (UD) a 1.852 m s.l.m. (Alpi Carniche). Nell'ambito della campagna di monitoraggio finalizzata allo studio dei laghi alpini come indicatori dei cambiamenti globali, 15 esemplari di scazzone sono stati campionati mediante elettropesca da imbarcazione e soppressi mediante un'overdose di MS-222. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame biometrico (peso e lunghezza) e necroscopico. Si è inoltre provveduto al prelievo ed alla fissazione in formalina neutra tamponata al 10% di campioni di branchie, cuore, fegato e gonadi per l'esame istologico. I tessuti sono stati processati, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di  $4 \pm 2 \mu$  e colorati con Ematossilina-Eosina (EE) e con le colorazioni istochimiche PAS e Tricromica di Masson (MT) rispettivamente per la valutazione degli epatociti e delle strutture gonadiche. I preparati sono stati osservati al microscopio ottico ad ingrandimenti crescenti (10x, 20x e 40x). All'esame anatomopatologico in tutti i soggetti sono state rilevate alterazioni evidenti solo a livello epatico: i fegati si presentavano infatti di colorito giallastro e di consistenza friabile. Gli altri organi si presentavano normotipici. All'esame istopatologico è stato possibile rilevare in 14 soggetti degenerazione vacuolare degli epatociti da lieve a grave con estensione da multifocale a diffusa; un solo soggetto non presentava alterazioni. In un soggetto, a livello branchiale, si è potuto apprezzare la presenza di una lieve malattia branchiale con fusione multifocale delle lamelle secondarie per iperplasia dell'epitelio con aree di fusione delle lamelle primarie. Il cuore e le gonadi apparivano normotipici. In particolare, riguardo queste ultime, i soggetti analizzati si presentavano equamente suddivisi in maschi e femmine. Il tessuto gonadico femminile presentava follicoli a differente stadio di maturazione, mentre in quello maschile i lobuli apparivano immersi in abbondante tessuto connettivo interstiziale. Questo lavoro fornisce un apporto alla conoscenza degli aspetti anatomo-istopatologici in scazzoni in condizioni naturali, anche se su un numero limitato di soggetti. Sulla base dei riscontri ottenuti, appare necessario ampliare il campionamento ed approfondire con ulteriori indagini istologiche ed istochimiche soprattutto l'aspetto della degenerazione vacuolare a livello epatico. Infatti, un unico lavoro sperimentale segnala alterazioni di questo tipo indotte artificialmente con fenoli, ma non si ritrovano in bibliografia segnalazioni in ambiente naturale. A questo riguardo risulta quindi importante approfondire le valutazioni anche in campo ambientale per correlare le lesioni con una possibile causa alimentare o d'inquinamento.

## RILIEVI ISTOLOGICI IN STORIONI SIBERIANI (*ACIPENSER BAERII*) ALIMENTATI CON FARINA DI MOSCA SOLDATO (*HERMETIA ILLUCENS*) A DIVERSO GRADO DI SOSTITUZIONE

Varello K.<sup>1</sup>, Caimi C.<sup>1,2</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Francese D.R.<sup>1</sup>, Santi M.<sup>1</sup>, Audino V.<sup>1</sup>, Bona M.C.<sup>1</sup>, Gai F.<sup>3</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>, Gasco L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Grugliasco (TO); <sup>3</sup> Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Grugliasco (TO)

Le farine di pesce rappresentano l'elemento principale delle diete utilizzate nell'allevamento ittico, ma negli ultimi anni la loro applicazione è stata messa in discussione sia per fattori economici che ambientali. A questo riguardo sono state valutate fonti proteiche alternative come la farina di soia o proteine trasformate di origine animale. Grazie al contenuto proteico ottimale e all'elevato valore biologico, le farine a base di proteine d'insetto potrebbero rappresentare un'ottima alternativa sia alle farine di pesce che a quelle vegetali. Alcuni esperimenti sono stati condotti usando le larve di mosca soldato (*Hermetia illucens* - HI) per l'alimentazione di differenti specie come la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) ed il salmone atlantico (*Salmo salar*), ma non sono ancora stati eseguiti studi sugli storioni.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le alterazioni istologiche indotte da diete contenenti percentuali diverse di HI sull'apparato digerente di storioni siberiani (*Acipenser baerii*). Trecentocinquanta due storioni sono stati alimentati *ad libitum* per 118 giorni con diete sperimentali contenenti: il 70% di Farina di pesce (FP); HI in sostituzione al 25% della FP (HI<sub>25</sub>); HI in sostituzione al 50% della FP (HI<sub>50</sub>); 32% di FP e 49% di farine proteiche vegetali senza inclusione di HI (CV). Al termine della prova, sono stati campionati 32 soggetti, (8 soggetti/trattamento) e soppressi mediante un'overdose di MS-222. Ogni soggetto è stato sottoposto ad esame necroscopico ed al prelievo di stomaco, valvola spirale e fegato. Gli organi sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, processati, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di  $4 \pm 2 \mu$ , colorati con Ematossilina-Eosina (EE), PAS, Alcian blue (AB) e Tricromica di Masson (MT). Il fegato è stato valutato sulla base della degenerazione lipoidea (*grading* 0-3) e dell'infiltrato infiammatorio, mentre per l'apparato digerente è stata considerata la conservazione dell'epitelio, associata allo stato di conservazione dei villi (fusione, ispessimento lamina propria e infiltrato linfocitario) per la valvola spirale, la quale è considerata l'organo target in questa specie per tali valutazioni. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica con software statistico Stata 14.1.

I soggetti sottoposti alle diete FP e HI<sub>25</sub> hanno mostrato un minor accumulo lipidico a livello epatico, mentre i soggetti del trattamento HI<sub>50</sub> e CV hanno mostrato valori più elevati. Le valvole spirali hanno presentato villi ed epitelio di assorbimento meglio conservati nei soggetti del trattamento FP e HI<sub>25</sub>, mentre nei soggetti dei gruppi HI<sub>50</sub> e CV era rilevabile un peggioramento del quadro intestinale con riduzione della superficie di assorbimento. Non si sono riscontrate alterazioni istopatologiche significative tra i soggetti a livello gastrico. I dati ottenuti non sono risultati statisticamente significativi.

Lo studio ha messo in evidenza come l'uso della farina di *Hermetia illucens* in sostituzione al 25% della farina di pesce, possa essere una valida alternativa per l'alimentazione dello storione siberiano.

Ulteriori valutazioni relative alla morfometria dei villi intestinali e l'implementazione del numero di soggetti analizzati, permetteranno di approfondire il reale potenziale di utilizzo delle fonti proteiche a base d'insetto.

## VALUTAZIONE EMATOLOGICA SU ESEMPLARI DI GATTUCCIO BOCCANERA (*GALEUS MELASTOMUS*) DEL BASSO TIRRENO

Briguglio G.<sup>1</sup>, Suraci V.<sup>2</sup>, Arfuso F.<sup>1</sup>, Cantarella S.<sup>1</sup>, Fazio F.<sup>1</sup>, Marino F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università Degli Studi Di Messina; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina.

L'ematologia di *Galeus melastomus* non è ad ora del tutto nota, tuttavia gli squali sono un'importante risorsa per gli umani sia in campo economico, per la salute, per lo studio della biodiversità, sia per i contesti di conservazione di specie. Durante una campagna di campionamento avvenuta tra il Novembre 2016 ed il Febbraio 2017, 20 esemplari di *G. melastomus* sono stati catturati per gli studi ematologici. Gli esemplari sono stati catturati nelle acque antistanti Brolo e Punta Naso (Messina), a circa 400 m di profondità. Gli studi ematologici sono stati standardizzati per questa specie, seguendo comunque quelle che sono le tecniche ematologiche applicate in genere sugli elasmobranchi.

I prelievi di sangue sono stati effettuati su organismi preventivamente anestetizzati, i campioni sono stati analizzati repentinamente in modo da evitare la possibile degradazione del campione. Nonostante il veloce processo di coagulazione sanguina, sono state “facilmente” effettuati gli esami di routine: striscio di sangue, ematocrito, conte cellulari (RBC, HCT, TC, WBC), determinazione della formula leucocitaria (conta differenziale) ed esame morfo-dimensionale. Gli esemplari campionati hanno dimostrato delle differenze statistiche tra le conte maschili e femminili, mentre sotto l'aspetto morfologico e dimensionale non si è evidenziata alcuna differenza.

Lo studio del coefficiente di variabilità, tra la popolazione maschile e femminile degli esemplari in esame ha dimostrato una significatività, tale da far presumere una differenza fisiologica o etologica che possa andare ad incidere sulle conte eritrocitarie. È stato di fatti riscontrato che i soggetti maschili esaminati hanno evidenziato una RBC dell'ordine dei 3 milioni, mentre gli esemplari femminili evidenziano RBC nell'ordine dei 2 milioni. La morfologia e le dimensioni cellulari non sono dissimili da quelle di altre specie di elasmobranchi.

I risultati ottenuti rappresentano uno studio preliminare per questa specie, ulteriori indagini dovranno essere effettuate.

## OVERVIEW SUGLI EPISODI DI MORTALITÀ DELL'ITTIOFAUNA SELVATICA NEI CORSI D'ACQUA DEL TRIVENETO NEL PERIODO 2011-2016

Bille L., Toson M., Ceolin C., Silvagni A., Dalla Pozza M., Manfrin A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

Gli episodi di mortalità anomala dell'ittiofauna selvatica sono spesso conseguenza di eventi naturali, come ad esempio un abbassamento improvviso dei livelli di ossigeno disciolto nell'acqua. Nella maggior parte dei casi, però, le cause non vengono individuate. Diversi sono i motivi per cui questo probabilmente si verifica: mancato coordinamento tra i vari enti coinvolti, sovrapposizione degli stessi nelle attività da compiere, ritardi nell'intervento, raccolta di campioni in cattivo stato di conservazione e incompleta raccolta delle informazioni necessarie ad una corretta diagnosi. La mancanza di riscontri diagnostici, oltre ad influenzare negativamente l'opinione pubblica, contribuisce a demotivare gli attori coinvolti nella gestione di queste situazioni. In tale contesto, il presente lavoro si propone di revisionare i dati disponibili relativamente ai casi di mortalità anomala verificatisi nel Triveneto nel periodo compreso tra il 2011 e il 2016, in modo da dare una panoramica sulle tipologie di eventi registrati e fornire un'analisi critica sullo stato dell'arte della gestione di tale fenomeno. I dati disponibili relativi alla casistica per cui sono stati conferiti campioni all'IZSVe sono stati estratti dal gestionale di laboratorio, successivamente integrati con le informazioni disponibili nelle schede accompagnatorie dei campioni ed elaborati. Nel periodo considerato si sono registrati in totale 93 episodi di mortalità anomala che hanno visto coinvolte le specie maggiormente presenti nei corsi d'acqua del nord est italiano, tra cui ciprinidi, salmonidi e anguille. Sul totale degli eventi, il 61% si è verificato in Veneto, il 29% in Trentino Alto Adige e il 10% in Friuli Venezia Giulia. Gli enti coinvolti nei vari casi sono risultati diversi, ma i principali sono stati i servizi veterinari territoriali, la polizia provinciale e gli uffici caccia e pesca. Dalla valutazione delle schede accompagnatorie dei campioni è emerso che vengono utilizzati diversi format disponibili ma, salvo alcune eccezioni, l'elemento comune risulta essere la mancanza o scarsità di informazioni anamnestiche sulle dinamiche dell'episodio. Dall'analisi dell'andamento temporale emerge che la maggior parte dei casi si verifica nei mesi più caldi, probabilmente a causa della carenza di ossigeno che si verifica in condizioni di temperatura elevata e basse portate dei fiumi e torrenti. I casi di mortalità anomala sono stati investigati dal punto di vista diagnostico sempre mediante esame anatomo patologico, seguito poi da accertamenti per la verifica della presenza di agenti virologici, batteriologici e ricerca di sostanze tossiche (metalli e pesticidi). In 8 casi non è stato possibile eseguire alcuna analisi a causa dell'avanzato stato di putrefazione dei soggetti conferiti. Nel 67% dei casi tutte le analisi eseguite sono risultate negative. Negli altri casi sono stati identificati primariamente agenti batterici e virali, tra cui VHSV, KHVV e IPNV. In due casi è stata riscontrata la presenza di piretroidi nei tessuti, ma solo per uno di questi è possibile dire con certezza che si sia trattato di avvelenamento, perché nell'altro non è dato sapere se il riscontro delle medesime sostanze tossiche ci sia stato anche nelle acque. Complessivamente quindi si può affermare che solo per circa l'8% dei casi sul totale di quelli investigati nel Triveneto nel periodo in esame è stato possibile identificare una causa con un certo grado di sicurezza. Il presente lavoro sottolinea la forte necessità di avere una procedura condivisa a livello nazionale per la gestione delle mortalità anomale ittiche, in modo che siano definiti gli enti preposti ad intervenire, i tempi e i modi per farlo, le modalità di raccolta delle informazioni, dei campioni e il loro successivo invio al laboratorio di competenza.

## MORTALITÀ ANOMALA DI ITTIOFAUNA SELVATICA CAUSATA DA PIRETROIDI

Bille L.<sup>1</sup>, Binato G.<sup>1</sup>, Gabrieli C.<sup>2</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, Pretto T.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>, Dalla Pozza M.<sup>1</sup>, Angeletti R.<sup>1</sup>, Arcangeli G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); <sup>2</sup> Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto, Padova

Gli episodi di mortalità anomala dell'ittiofauna selvatica sono fenomeni dal forte impatto sull'opinione pubblica, in quanto sospetti di probabile correlazione con episodi d'inquinamento dell'ambiente acquatico. Essi sono spesso conseguenza di eventi naturali che possono comportare il decesso per ipossia dovuto ad abbattimento momentaneo dei livelli di ossigeno disciolto nell'acqua, ma nella maggior parte dei casi, nonostante valutazioni approfondite e multidisciplinari, le cause della mortalità rimangono sconosciute. Le specie ittiche sono molto sensibili ai pesticidi e, tra questi, la classe dei piretroidi è riconosciuta come quella con maggiori effetti tossicologici nell'ambiente acquatico. Nonostante essi siano largamente utilizzati a livello mondiale come insetticidi e antiparassitari in ambito domestico e agricolo, i casi riportati in letteratura di mortalità dell'ittiofauna correlabili alla loro presenza nell'acqua sono molto rari.

Il presente lavoro descrive un episodio di mortalità anomala verificatosi nel 2014 in un canale di scolo consorziale situato nella parte meridionale della provincia di Padova (Veneto), in una zona caratterizzata da consolidate attività di agricoltura intensiva e dalla presenza di insediamenti industriali. Tale mortalità anomala ha coinvolto circa 4 tonnellate di ittiofauna di diverse specie e dimensioni, e si è manifestata in concomitanza al riscontro nel canale della presenza di un liquido bianco con forte odore chimico proveniente dal condotto di raccolta delle acque meteoriche della vicina zona industriale. Le analisi svolte sui campioni d'acqua hanno evidenziato la presenza di cipermetrina, permetrina, deltametrina e tetrametrina, con concentrazioni variabili a seconda del punto di campionamento, ma comunque ben superiori alle dosi tossiche (DL<sub>50</sub> 96h) disponibili in letteratura per ciascun composto. I pesci campionati, appartenenti alle specie *Cyprinus carpio* (n=4), *Carassius carassius* (n=2) e *Silurus glanis* (n=4), si presentavano in avanzato stato di putrefazione, pertanto l'esame autoptico non ha permesso di evidenziare particolari lesioni anatomo-patologiche. Tuttavia, tracce di cipermetrina e permetrina sono state ritrovate in tutti i tessuti dei soggetti analizzati, con range di concentrazioni pari rispettivamente a 476-2834 µg/kg e 346-2826 µg/kg su base lipidica. Circa 6 mesi dopo la mortalità sono stati raccolti, dallo stesso canale, due campioni di ittiofauna per i quali le analisi chimiche hanno dato esito negativo per la ricerca di piretroidi, a conferma del fatto che i livelli di contaminazione precedentemente riscontrati potevano ragionevolmente essere correlabili all'episodio di inquinamento appena verificatosi. Stando alle conoscenze disponibili, il presente lavoro rappresenta il primo caso documentato in Italia di mortalità anomala di pesce causata da pesticidi piretroidi. Durante le indagini svolte, sono emerse diverse criticità, soprattutto in merito al coordinamento tra i vari Enti coinvolti. Questo episodio sottolinea quindi l'importanza di avere un protocollo condiviso e approvato a livello nazionale per la gestione delle mortalità anomale dell'ittiofauna selvatica, che definisca i ruoli delle diverse istituzioni che a vario titolo possono essere coinvolte e permetta di limitare la sottostima della casistica legata ad una mancata diagnosi.



## POLIBROMODIFENILETERI (PBDE) IN PESCI DEL MAR LIGURE: DATI PRELIMINARI

Squadrone S.<sup>1</sup>, Piersanti A.<sup>2</sup>, Tavoloni T.<sup>2</sup>, Scortichini G.<sup>2</sup>, Menotta S.<sup>3</sup>, Fedrizzi G.<sup>3</sup>, Ferrari A.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Abete M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bologna

I polibromodifenileteri (PBDE) sono sostanze chimiche utilizzate nell'industria come ritardanti di fiamma. Strutturalmente sono costituiti da due anelli aromatici legati a un atomo di ossigeno centrale a formare un etere; i congeneri, 209, differiscono per il numero e posizione degli atomi di bromo sui due anelli aromatici. Sono composti stabili, molto lipofili e scarsamente solubili in acqua; ubiquitari, sono stati ritrovati sia nelle zone di produzione e utilizzo, sia in regioni remote come le zone artiche o i fondali oceanici. Questa classe di composti è stata riscontrata nelle matrici più disparate: mare, fiumi, biota terrestre e marino, fluidi biologici umani. In alcune aree geografiche i loro livelli sono anche più elevati di quelli dei policlorobifenili e a causa della loro persistenza nell'ambiente e del fenomeno di biomagnificazione lungo le reti alimentari sono considerati contaminanti emergenti di particolare interesse. I dati tossicologici sui mammiferi hanno suggerito che i PBDE possano agire come interferenti endocrini e determinare effetti avversi nello sviluppo neurologico e neuro comportamentale. In seguito alla Raccomandazione UE del 3 marzo 2014 gli Stati membri sono stati sollecitati a monitorare la presenza di PBDE in diverse matrici alimentari tra cui i prodotti della pesca in mare.

Sono stati pertanto analizzati per la ricerca di PBDE pesci provenienti dal mar Ligure tra cui acciughe (*Engraulis encrasicolus*), sgombrì (*Scomber scombrus*) e triglie (*Mullus surmuletus*). Sono stati quantificati tramite gascromatografia-spettrometria di massa tandem i seguenti congeneri: BDE-28, BDE-47, BDE-49, BDE-66, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-180 e la loro somma ( $\Sigma$ PBDE), espressi in pg/g peso umido.

I congeneri BDE-66, BDE-85 e BDE-183 sono risultati inferiori al limite di quantificazione (LOQ) del metodo, mentre in accordo con la bibliografia il congenere BDE-47 è il più rappresentato nei pesci, con un range < LOQ-178 pg/g (concentrazione media 79 pg/g). A seguire i congeneri BDE-100 (media 46 pg/g, range < LOQ-65 pg/g), BDE-154 (media 43 pg/g, range < LOQ-69 pg/g), BDE-49 (media 38 pg/g, range < LOQ-88 pg/g), BDE-99 (media 35 pg/g, range < LOQ-63 pg/g), BDE-153 (media 9.2 pg/g, range < LOQ-15 pg/g), BDE-28 (media 5.3 pg/g, range < LOQ-5.3 pg/g).

La sommatoria dei 10 congeneri analizzati,  $\Sigma$ PBDE, ha fatto rilevare un livello massimo di 382 pg/g e una media di 216 pg/g peso umido, valori inferiori a quanto riscontrato da Martellini e coautori ( $\Sigma$ PBDE media 524 pg/g peso umido, 2016) in pesci provenienti dal Mediterraneo.

I congeneri BDE-47 and BDE-99 erano tra i componenti principali, in rapporto di almeno 1:1, delle miscele commerciali che venivano utilizzate nell'industria; negli studi ambientali questo rapporto viene generalmente confermato, con la concentrazione di BDE-47 uguale o leggermente superiore a quella del BDE-99. In un'indagine effettuata in Italia su matrici alimentari, è stato riscontrato un rapporto tra i due congeneri di circa 2 per carni, uova, molluschi e prodotti lattiero caseari, più alto per i pesci e l'olio di pesce, in accordo con quanto rilevato nel nostro studio in cui la ratio BDE47/BDE99 è 3,8. La concentrazione più alta del BDE 47 nel pesce potrebbe esser dovuta alla grande resistenza alla degradazione di questo congenere o a un potenziale più alto di biomagnificazione, inoltre alcuni studi di fotolisi hanno dimostrato che nella degradazione del BDE-99 si forma BDE-47, contribuendo a innalzare il livello di quest'ultimo.

Questi dati preliminari confermano la presenza dei PBDE in pesci provenienti dal mar Ligure e la necessità di successivi approfondimenti.

## INDAGINE PRELIMINARE SULL'ACCUMULO DI METALLI PESANTI NELLA VONGOLA VERACE AUTOCTONA *RUDITAPES DECUSSATUS* IN ALCUNE ZONE UMIDE DELLA SARDEGNA

Esposito G.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>2</sup>, Antuofermo E.<sup>1</sup>, Meloni D.<sup>1</sup>, Pais A.<sup>3</sup>, Pastorino P.<sup>2,4</sup>, Abete M.C.<sup>2</sup>, Squadrone S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari (SS); <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO); <sup>3</sup> Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Sassari (SS); <sup>4</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste

La molluschicoltura rappresenta attualmente la principale voce produttiva dell'acquacoltura italiana e la Sardegna contribuisce al comparto nazionale con quantitativi medi annui di tutto rispetto. L'allevamento dei Molluschi Bivalvi, essendo praticato soprattutto nelle acque di transizione, come gli ecosistemi lagunari e/o nella fascia costiera, è per sua stessa natura un settore produttivo molto fragile. Questo aspetto è ascrivibile non solo a fenomeni naturali, ma soprattutto alle numerose attività industriali ed agricole, che rappresentano importanti fonti potenziali di contaminazione chimica. Tali ambienti rappresentano il modello più diffuso di sistemi di transizione nel Mediterraneo, il cui possibile stato d'inquinamento deve essere valutato sia in termini di stato di salute dell'ecosistema, sia di rischio diretto o indiretto per la salute umana. Pertanto i molluschi bivalvi, rivestono un ruolo di primaria importanza nella valutazione dei livelli di contaminazione delle acque. Questo fatto è legato alla loro vasta distribuzione geografica, alle loro abitudini sedentarie, alle loro dimensioni corporee e, spesso, al loro valore ecologico e/o economico.

A partire dall'ottobre 2016 sono stati sottoposti ad analisi esemplari adulti di vongola verace autoctona *Ruditapes decussatus* (lunghezza totale della conchiglia  $\geq 25$  mm) con l'obiettivo di valutare l'accumulo di metalli pesanti su questa specie di elevato interesse economico. Gli esemplari sono stati prelevati da 2 differenti zone salmastre aventi le seguenti caratteristiche: 1) presenza di consistenti insediamenti urbani ed industriali (Laguna di Santa Gilla, Cagliari); 2) presenza di consistenti attività alieutiche (Stagno di San Teodoro, Olbia-Tempio). La porzione edule di ogni mollusco è stata asportata dalla conchiglia ed omogeneizzata per le analisi chimiche. Il Mercurio (Hg) è stato quantificato attraverso analizzatore diretto di mercurio (DMA80, Milestone, Shelton, CT, USA), mentre gli altri elementi (Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Tl e Zn) mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS Xseries II, Thermo Scientific, Bremen, Germany). Nel dettaglio, le analisi hanno messo in evidenza che l'elemento predominante è l'alluminio (Al), con valori pari a  $207 \pm 72$  e  $113 \pm 29$  mg kg<sup>-1</sup>, rispettivamente per Santa Gilla e San Teodoro. L'impiego di tali organismi vivi da utilizzare come bioindicatori, pertanto, può costituire un valido strumento per il potenziamento dei piani di monitoraggio in zone vocate alla raccolta o all'allevamento estensivo di alcune di queste specie. Benché il criterio di classificazione delle zone di produzione sia esclusivamente di tipo microbiologico (determinazione di *E. coli* e *Salmonella* spp.) è comunque indispensabile monitorare periodicamente tali zone al fine di verificare i parametri biotossicologici e chimici per garantirne l'adequazione al consumo umano.

## **PROGETTO VETBIONET: VETERINARY BIOCONTAINED FACILITY NETWORK FOR EXCELLENCE IN ANIMAL INFECTIOLOGY RESEARCH AND EXPERIMENTATION**

Toffan A.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, VetBioNet- Consortium.

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

Il progetto Vet Bio Net (acronimo di “Veterinary Biocontained facility Network for excellence in animal infectiology research and experimentation”) ha come scopo principale il miglioramento della risposta della comunità scientifica alle sfide poste dall’emergere e riemergere delle patologie infettive degli animali. Per i prossimi 5 anni quindi, numerosi ricercatori provenienti da 30 istituzioni veterinarie appartenenti a 14 paesi europei, saranno impegnati a:

- Stabilire un network stabile di strutture BSL3 (laboratori e stabulari), organizzazioni internazionali e partner industriali, volto al potenziamento scientifico e tecnologico nella lotta alle malattie epizootiche e zoonotiche.
- Promuove lo scambio e l’utilizzo condiviso di strutture/strumenti all’avanguardia mediante i TNA (Transnational Access) tra paesi Eu e non.
- Assicurare la condivisione e l’armonizzazione tra gli enti coinvolti di: tecniche, protocolli e standard, anche e soprattutto in materia di biosicurezza, etica e benessere degli animali.
- Migliorare e coordinare la rapidità e la capacità di intervento in caso di malattia emergente-riemergente (preparedness plan).

Nel progetto sarà dato largo spazio anche alla formazione grazie all’organizzazione di eventi come “summer school” e corsi a distanza, inoltre si cercherà di rafforzare la crescita scientifica delle nuove generazioni di veterinari su argomenti complessi quali la biosicurezza, la bioetica e la sperimentazione animale.

L’IZSVE è coinvolto nel progetto VetBioNet per contribuire al miglioramento della diagnosi e allo studio della patogenesi delle principali malattie virali degli animali acquatici, come VHS, IHN, KHV e NNV. Inoltre nell’ambito dei TNAs, verrà messo a disposizione della comunità l’utilizzo dell’acquario sperimentale dell’IZSVE.

Per ulteriori informazioni: [www.vetbionet.eu](http://www.vetbionet.eu)

## **SVILUPPO INTEGRATO ACQUACOLTURA NEL MEDITERRANEO: IL PROGETTO MEDAID**

Toffan A.<sup>1</sup>, Dalla Pozza M.<sup>1</sup>, Panzarin V.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, Bille L.<sup>1</sup>, MEDAID- Consortium.

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

L'acquacoltura Europea copre circa il 20% della produzione ittica e dà lavoro a circa 85 000 persone, soprattutto nelle zone rurali e costiere. L'Europa però consuma attualmente due volte la quantità di prodotto ittico che produce e tale gap è colmato dal prodotto di importazione.

Diversamente dal marcato sviluppo dell'acquacoltura nei paesi extra-EU, la produzione in Europa è stagnante. Poiché la Commissione Europea ha proposto di incrementare del 20% la produzione sostenibile d'acquacoltura nel Mediterraneo, è nato MedAID, un ambizioso progetto scientifico.

MedAID (Sviluppo Integrato Acquacoltura nel Mediterraneo), avviato lo scorso maggio, è un progetto di ricerca della durata di 4 anni, finanziato dall'Unione Europea (programma di ricerca e sviluppo Horizon H2020), che affronterà gli aspetti chiave necessari a migliorare la produzione di acquacoltura del Mediterraneo. Mettendo a fuoco le problematiche produttive per orata e spigola, le principali specie allevate nel Mediterraneo, il progetto mira infatti ad incrementare la competitività e sostenibilità dell'intero settore. In MedAID verranno affrontati tutti gli aspetti rilevanti del settore tra cui: nutrizione e buone pratiche di alimentazione, salute e benessere degli animali, genetica ed allevamento, impatto ambientale, percezione dei consumatori, marketing, aspetti economici e performance di settore e aspetti/vincoli normativi da migliorare.

Collaborando con gli tutti gli attori coinvolti nella filiera produttiva, MedAID si propone di trovare strumenti innovativi e soluzioni efficaci per incrementare la crescita e la produttività del settore.

MedAID, che ha ricevuto un finanziamento di 7 milioni di euro nell'ambito del programma di ricerca e innovazione della Commissione Europea H2020, è coordinato dall' Istituto Agronomico Mediterraneo di Saragozza (IAMZ-CIHEAM) insieme all'Istituto per la ricerca e la tecnologia di alimentazione e l'agricoltura della Catalogna (IRTA), e coinvolge 34 diverse organizzazioni/istituzioni appartenenti a 12 paesi, tra cui l'Italia.

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), è coinvolto in MedAID nelle attività riguardanti la salute ed il benessere animale. In particolare si occuperà di epidemiologia e armonizzazione dei protocolli per la diagnosi delle principali malattie infettive che colpiscono la spigola e l'orata. Particolare attenzione verrà posta alla prevenzione dell'encefalopatia e retinopatia virale (VER), il principale problema sanitario del bacino del Mediterraneo, mediante lo sviluppo di nuovi prototipi vaccinali.

Per ulteriori informazioni: [www.medaids-h2020.eu](http://www.medaids-h2020.eu)

## WIN-FISH: BENESSERE, SALUTE E INDIVIDUALITA' NELLE SPECIE ITTICHE ALLEVATE

Fiocchi E.<sup>1</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Winberg S.<sup>2</sup>, Bégout M.L.<sup>3</sup>, Roque A.<sup>4</sup>, Villarroel M.<sup>5</sup>, Lembo G.<sup>6</sup>, Gesto M.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, CSI Adria (RO); <sup>2</sup>Uppsala Universitet, Svezia; <sup>3</sup>IFREMER, Francia; <sup>4</sup>IRTA, Spagna; <sup>5</sup>UPM, Spagna; <sup>6</sup>COISPA, Torre a Mare (BA); <sup>7</sup>DTU Aqua, Danimarca.

In acquacoltura, le specie ittiche sono esposte a diversi stress derivanti dalle diverse tecniche di allevamento, che possono compromettere la salute e il benessere degli animali, con conseguenze sulla produzione e sulla qualità del prodotto finale.

Per questo motivo, negli ultimi anni, sono in aumento gli studi per chiarire quali reazioni avvengono nell'animale affetto da stress. Le risposte possono essere differenti da specie a specie ed individuali: i singoli individui sottoposti a stress come sbalzi di temperatura, salinità, densità e trasporto possono reagire e combattere le azioni stressanti acute o croniche in diversi modi e tali reazioni vengono classificate come stress coping styles (SCS).

Nelle specie ittiche la cronicizzazione delle risposte a questi stimoli può causare reattività, aggressione, paura e minor consumo di cibo. Spesso viene trovata una relazione negativa con i livelli di cortisolo e altri biomarcatori presenti nel plasma a cui solitamente è associata a una maggiore suscettibilità alle malattie causata da una diminuzione della risposta immunitaria.

L'obiettivo principale del progetto WIN-FISH è di investigare la rilevanza dell'individualità delle specie ittiche per valutarne il benessere e le prestazioni in diverse condizioni di allevamento.

Il consorzio WIN-FISH è composto da 6 partners provenienti da 5 paesi europei: saranno validati gli indicatori fisiologici, comportamentali e di benessere in orata (*Sparus aurata*), branzino (*Dicentrarchus labrax*) e trota (*Oncorhynchus mykiss*) a livello individuale e di gruppo, sia durante gli stadi giovanili che adulti.

Questi studi genereranno nuove informazioni riguardanti le risposte ai fattori ambientali e conoscenze che potranno essere applicate per migliorare le pratiche di allevamento e di gestione. Il sistema moderno di ricircolo in acquacoltura (RAS), ad esempio, risulta fortemente connesso con diversi fattori di stress come la maggiore densità di allevamento e i parametri chimico-fisici della qualità dell'acqua, che possono influenzare il benessere dei pesci.

In WIN-FISH, a gruppi di orate (*Sparus aurata*) e branzini (*Dicentrarchus labrax*) allevati a diverse densità, saranno monitorati gli stati di salute, benessere e produzione correlati agli effetti del RAS. Al fine di tener conto delle variazioni individuali, questi studi saranno eseguiti su animali a cui è già stato eseguito uno screening iniziale per verificare i vari SCS. Allo stesso modo, effetti sulla salute, benessere e produzione saranno ulteriormente approfonditi in orata (*Sparus aurata*) analizzando diversi biomarcatori di stress (Malondialdeide, Nitrotirosina, 4-Idrossinonenale e *Heat Shock Protein 70*) utilizzando tecniche di biologia molecolare (RT Real-Time PCR) ed immunoistochimica. Ci si soffermerà anche sull'ambiente di allevamento: infatti è noto che, in generale, un arricchimento ambientale ha effetti positivi sul benessere degli animali. WIN-FISH indagherà sulle conseguenze dell'arricchimento ambientale nella trota (*Oncorhynchus mykiss*) contraddistinte da diversi SCS.

Verrà anche eseguita un'ampia analisi di associazione del genoma nel salmone (*Salmo salar*), nel tentativo di generare marcatori genetici per migliorare l'allevamento di questa specie. Infine, zebrafish (*Danio rerio*) verrà utilizzato come modello per acquisire ulteriori conoscenze sui meccanismi alla base degli SCS e del comportamento aggressivo degli animali.

# INDICE

## PRIMI AUTORI

		<b>PAGINA</b>
Agnetti F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia</i>	27
Antuofermo E.	<i>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari</i>	66
Azzarone M.	<i>Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna</i>	63
Bedendo G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	18
Beraldo P.	<i>Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Sez. di Scienze Animali e Veterinari, Università di Udine</i>	17, 30
Bille L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	21, 75, 76
Briguglio G.	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università Degli Studi Di Messina</i>	74
Byadgi O.	<i>Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Sez. di Scienze Animali e Veterinari, Università di Udine</i>	28
Cammilleri G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri</i>	64
Canola S.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	50
Capparucci F.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina</i>	71
Cocchi M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	26
Corti I.	<i>Consulente Veterinario, Milano</i>	62, 70
De Benedetto G.	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina</i>	67
De Zan G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	53
Dezzutto D.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	51
Di Caro G.	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina</i>	41
Elia A.C.	<i>Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università di Perugia</i>	40
Esposito G.	<i>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari</i>	78

		<b>PAGINA</b>
Fiocchi E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	24, 38, 49, 81
Galuppi R.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma mater Studiorum - Università di Bologna</i>	57
Iaria C.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina</i>	34, 69
Mandas D.	<i>Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Oristano</i>	42
Manfrin A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	37
Massimo M.	<i>Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A), Università degli Studi di Udine</i>	29
Menconi V.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna</i>	65
Pascoli F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	19
Pastorino P.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	39, 52, 72
Perolo A.	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD)</i>	59
Prearo M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	44, 54
Pretto T.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	23
Quaglio F.	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD)</i>	33
Ricci E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Pisa</i>	47
Righetti M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	56
Saitta M.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali Università di Messina, Messina</i>	31
Salogni C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna - Brescia</i>	22, 68
Santi M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	60



		PAGINA
Scopelliti F.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina</i>	61
Sgariglia E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Terni; 2DVM, Perugia</i>	25
Squadrone S.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	77
Susini F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri”, Pisa</i>	48
Tedesco P.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna</i>	32
Toffan A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	45, 79, 80
Trevisanato R.	<i>Dipartimento di Biologia, Università di Padova</i>	46
Valentini A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Terni &amp; Perugia</i>	36
Varello K.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	73
Volpatti D.	<i>Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Sez. di Scienze Animali e Veterinari, Università di Udine</i>	58
Volpe E.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)</i>	20, 35
Zago V.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	55

# INDICE

# AUTORI

Abbamonte G.	72	Caldaroni B.	40
Abete M.C.	39, 77, 78	Cammilleri G.	64
Accini A.	22, 59	Canola S.	50, 51
Agnetti F.	25, 27, 36	Cantarella S.	74
Alborali G.L.	22, 68	Capparucci F.	67, 71
Angeletti R.	76	Capucchio M.T.	40
Angiolillo S.	44	Caputo S.	31
Antuofermo E.	42, 66, 78	Cardeti G.	47
Arcangeli G.	76	Casarotto C.	21
Arfuso F.	74	Cassata G.	41
Arsieni P.	50, 51, 60	Cavazza G.	50, 60
Audino V.	73	Ceolin C.	21, 75
Azzarone M.	63	Ciardo M.L.	32
Banco B.	70	Ciulli S.	20, 35, 41
Barbè T.	35	Civettini M.	38, 55
Barbero R.	51	Cocchi M.	21, 26, 49, 53
Basaglia M.	38	Cocumelli C.	47, 48
Bedendo G.	18	Colafranceschi I.	62
Bégout M.L.	81	Collura R.	64
Belmusto G.	61	Corti I.	34, 62, 67, 70
Belvedere A.	61	Costa A.	64
Beraldo P.	17, 28, 29, 30, 58	Costa A.	63
Bergagna S.	51	Dalla Pozza M.	21, 26, 59, 75, 76, 80
Bertoli M.	39, 52, 72		
Bertotto D.	37	D'Alonzo A.	48
Bille L.	21, 75, 76, 80	De Benedetto G.	61, 67, 71
Binato G.	76	Del Tedesco F.	37
Biosa T.	44	De Marco L.	44
Bona M.C.	50, 52, 54, 73	Deotto S.	26, 49, 53
Bonasoro I.	69	De Zan G.	26, 53
Borella L.	22	Dezzutto D.	51
Bossù T.	47	Di Blasio A.	52
Bozzetta E.	51, 72, 73	Di Caro G.	41
Briguglio G.	74	Diéguez-Uribeondo J.	57
Bulfon C.	28, 29, 30, 58	Di Giusto T.	53
Buonocore F.	19	Dörr A.J.M.	40
Buratin A.	45	Elia A.C.	40
Buscemi M.D.	64	Epifanio E.	25, 27, 36
Byadgi O.	28, 29, 30, 58	Errani F.	35
Caffara M.	27, 63, 65	Esposito G.	56, 66, 78
Caimi C.	73	Fabris A.	21
Cainero M.	57	Farina M.	44

Fazio F.	74	Lunelli F.	59
Fedrizzi G.	77	Magara G.	40
Ferrantelli V.	64	Magi G.E.	58
Ferrari A.	77	Malandra R.	62, 67, 70
Ferrè N.	21	Malosio M.	70
Fiasconaro M.	69	Mandas D.	42
Fiocchi E.	24, 37, 38, 48, 49, 81	Mandrioli L.	35
Fioravanti M.L.	23, 27, 32, 33, 57, 59, 63, 65	Manfrin A.	21, 23, 24, 37, 38, 46, 48, 49, 55, 75, 76, 81
Fioretti M.	47	Manghisi A.	31
Fortin A.	18	Manuali E.	36
Francalacci C.	48, 65	Marino F.	31, 34, 41, 61, 67, 69, 71, 74
Franceschini V.	35	Marsella A.	25, 27, 36
Francesse D.R.	72, 73	Masoero L.	44
Gabrieli G.	76	Massimo M.	28, 29, 30, 58
Gaglio G.	31, 61, 62	Mazzullo G.	34
Gai F.	40, 73	Medaid-Consortium	80
Galeotti M.	17, 28, 29, 30, 58	Meloni D.	78
Galuppi R.	32, 57	Menconi V.	57, 59, 65
Ganci F.	64	Menotta S.	77
Gasco L.	40, 73	Milla F.	44
Gennero M.S.	51	Mugetti D.	56
Gesto M.	81	Mulatti P.	21
Ghisleni G.	70	Pais A.	78
Ghittino C.	25, 27, 36	Palei M.	21
Giangrosso G.	64	Panzarin V.	18, 20, 21, 80
Gibelli L.R.	68	Pascoli F.	18, 19, 23, 45, 53, 76, 79, 80
Graci S.	64	Pastorino P.	39, 44, 50, 51, 52, 54, 56, 60, 72, 78
Grodzki M.	20	Pecoraro R.	41
Guazzo A.	19	Pedron C.	54
Guercio A.	20	Perolo A.	33, 59
Guerrera M.C.	41	Piersanti A.	77
Gustinelli A.	27, 33, 57, 59, 63, 65	Piga S.	56, 66
Iannazzo I.	64	Pigoli C.	68
Iaria C.	34, 41, 67, 69, 71	Pizzul E.	39, 52, 72
Incardona A.	64	Polinas M.	66
La Cavera E.	69	Prearo M.	39, 40, 44, 50, 51, 52, 54, 56, 60, 66, 72, 73, 77, 78
Lanteri G.	34, 41		
Lavazza A.	68		
Lazzari M.	35		
Lembo G.	81		

Pretto T.	23, 38, 46, 48, 76	Tedesco P.	32, 57
Prosperi A.	68	Toffan A.	18, 19, 21, 44, 45, 47, 53, 76, 79, 80
Puleio R.	69	Toson M.	21, 24, 75
Purpari G.	20	Trevisanato R.	46
Quaglio F.	33, 46, 59	Trombetta D.	61
Quartesan R.	21	Ustulin M.	26
Ranghieri V.	70	Valentini A.	25, 27, 36
Ricci E.	47, 48	Valerioti S.	69
Righetti M.	40, 44, 50, 51, 52, 54, 56, 60	Varello K.	72, 73
Ronza P.	58	Vella A.	64
Roque A.	81	VetBioNet-Consortium	79
Ruggeri J.	68	Villa R.	68
Saitta M.	31, 71	Villarroel M.	81
Salati F.	42	Vio D.	21
Salogni C.	18, 22, 68	Volpatti D.	28, 29, 30, 58
Sandoval-Sierra J.V.	57	Volpe E.	20, 35
Santangelo F.	64	Winberg S.	81
Santi M.	44, 52, 54, 56, 60, 66, 73	Zago V.	55
Saragaglia C.	60	Zaltum O.	55
Sarli G.	35	Zambon M.	23, 24, 48, 49, 55
Sarti M.	17	Zamperin G.	18
Scaglione F.E.	27	Zanolla S.	58
Scagliotti P.	44		
Scanzio T.	54		
Scapigliati G.	19		
Scarponi D.	63		
Scirocco T.	63		
Scoparo M.	40		
Scopelliti F.	61		
Scortichini G.	77		
Serratore P.	20		
Sgariglia E.	25, 27, 36		
Siclari A.	61		
Sicuro B.	50		
Silvagni A.	75		
Sirri R.	35		
Squadrone S.	39, 77, 78		
Suraci V.	74		
Susini F.	47, 48		
Tavoloni T.	77		
Tecilla M.	70		